



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS



**FUNGOS DEGRADADORES DE COMPOSTOS
ORGÂNICOS RECALCITRANTES SOB CONDIÇÕES
MICROAERÓBIA E ANAERÓBIA**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Ísis Serrano Silva**, aprovada pela Comissão Julgadora em 05 de novembro de 2002.

Campinas, 05 de novembro de 2002.

Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant
Presidente da Banca

Ísis Serrano Silva
Bióloga

Profª Drª Lucia Regina Durrant
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos

2002

-i-

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TUNICAMP
	Si38f
V	EX
TOMBO BC/	51863
PROC.	16-837-02
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	16/12/02
Nº CPD	

CM00177073-8

BIB ID 272484

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

Si38f Silva, Ísis Serrano
Fungos degradadores de compostos orgânicos recalcitrantes sob condições microaeróbia e anaeróbia / Ísis Serrano Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Lucia Regina Durrant
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Fungos. 2.Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 3.Enzimas. 4.Anaerobiose. I.Durrant, Lucia Regina. II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Lucia Regina Durrant
(orientadora)



Prof^a. Dr^a. Hélia Harumi Sato
(membro)



Prof^a. Dr^a. Tânia Akiko Anazawa
(membro)

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
(suplente)

*“Oh ! Que me abenções
e me alargues as fronteiras,
que seja comigo a Tua mão
e me preserves do mal
de modo de não me sobrevenha aflição!”*

(Oração de Jabez – 1 Crônicas 4: 9-10)

À Deus, por tudo de maravilhoso que Ele me concede.
À minha querida Mãe, pela dedicação e amizade de muitas vidas.
Ao meu grande e Eterno Amor, Mazinho, para sempre no meu coração.

Dedico

À Prof^a. Dr^a. Lucia Regina Durrant pela orientação, amizade e por acreditar no meu potencial.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado, tornando possível a realização deste projeto.

Aos professores do Departamento de Microbiologia e Biologia Molecular do IB - UNICAMP: Prof^a Dr^a Lucila Costallat Ricci, Prof^a Dr^a Sivia Viccari Gatti e Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira pelo incentivo aos meus primeiros passos na área de pesquisa através da iniciação científica.

À Érika e Andréa por estarem sempre prontas a me ajudar no início de tudo e ao pessoal do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, pelos momentos de alegria e descontração, pela força que ganheide todos no momento mais difícil da minha vida e, principalmente, pelo carinho de todas vocês.

À todos os meus familiares: vovolina, tias, tios, priminhos queridos, ao meu irmão, Renata; e ainda à querida Elisa, Inês e Tetê pela preocupação, pelo carinho e vibrações positivas.

À família Mamede pelo Amor, pela amizade e pelo lindo presente que me deram, um Presente Divino que me fez muito feliz na sua missão aqui na Terra.

Muito obrigada do fundo do meu coração a todos vocês!

ÍNDICE GERAL

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	xvi
ÍNDICE DE TABELAS	xx
RESUMO	xxv
SUMMARY	xxvi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	02
2.1. Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos	02
2.1.1. Formação dos HAPs	03
2.1.2. Transporte dos HAPs nos ecossistemas	04
2.1.3. HAPs em alimentos	05
2.1.4. Degradação dos HAPs	07
2.2. Biosurfactantes: seu papel na biodegradação	09
2.3. Lignina	11
2.4. Outros compostos orgânicos xenobióticos similares à estrutura da lignina	14
2.4.1. Ácido lignosulfônico	14
2.4.2. Ácido tânico	15
2.5. Enzimas ligninolíticas envolvidas na degradação de HAPs e outros compostos similares à lignina	18
2.5.1. Lignina-peroxidase	20
2.5.2. Manganês-peroxidase	22
2.5.3. Peroxidases	24
2.5.4. Polifenoloxidasas	25
2.5.4.1. Lacase	25
2.5.4.2. Tirosinase	27
2.5.5. Enzimas produtoras de H ₂ O ₂	28
2.6. Biorremediação	29
2.7. Biodegradação em ambientes microaeróbios e anaeróbios	31

3. OBJETIVOS	35
3.1. Condição microaeróbia	35
3.2. Condição anaeróbia	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1. Linhagens utilizadas	36
4.2. Manutenção das linhagens	36
4.3. Condições de cultivo em microaerobiose	37
4.3.1. Meio de cultivo	37
4.3.2. Fontes de carbono utilizadas	38
4.3.3. Geração de microaerofilia	38
4.3.4. Determinação do crescimento das linhagens	38
4.3.5. Determinação do pH e verificação da alteração de cor do meio de cultivo	39
4.3.6. Determinação das atividades de enzimas ligninolíticas	39
4.3.6.1. Lignina-peroxidase (LiP)	39
4.3.6.2. Manganês-peroxidase (MnP)	39
4.3.6.3. Peroxidase	40
4.3.6.4. Lacase	40
4.3.6.5. Tirosinase	41
4.3.7. Produção de biosurfactantes	42
4.3.7.1. Determinação de emulsificação óleo/água	42
4.3.7.2. Determinação de emulsificação água/óleo	42
4.4. Seleção das linhagens	43
4.5. Condições de cultivo em anaerobiose	43
4.5.1. Determinação das atividades de enzimas ligninolíticas	44
4.5.2. Produção de biosurfactantes	44
4.6. Degradação de compostos orgânicos recalcitrantes por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	45
4.6.1. Análise Cromatográfica	45
4.6.1.1. Degradação dos Hidrocarbonetos Armáticos Policíclicos	45

4.6.1.2. Degradação do Ácido Lignosulfônico	45
4.6.1.3. Degradação do Ácido Tânico	46

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

PARTE I:

5.1. Condição microaeróbia	47
5.1.1. Naftaleno	47
5.1.1.1. Crescimento das linhagens em naftaleno	47
5.1.1.2. Determinação das atividades de enzimas ligninolíticas	49
5.1.1.3. Atividade de biosurfactantes	50
5.1.2. Fenantreno	54
5.1.2.1. Crescimento das linhagens em fenantreno	54
5.1.2.2. Determinação das atividades de enzimas ligninolíticas	56
5.1.2.3. Atividade de biosurfactantes	57
5.1.3. Criseno	61
5.1.3.1. Crescimento das linhagens em criseno	61
5.1.3.2. Determinação das atividades de enzimas ligninolíticas	63
5.1.3.3. Atividade de biosurfactantes	64
5.1.4. Perileno	68
5.1.4.1. Crescimento das linhagens em perileno	68
5.1.4.2. Determinação das atividades de enzimas ligninolíticas	70
5.1.4.3. Atividade de biosurfactantes	71
5.1.5. Naftol [2,3-a] pireno	75
5.1.5.1. Crescimento das linhagens em naftol [2,3-a] pireno	75
5.1.5.2. Determinação das atividades de enzimas ligninolíticas	77
5.1.5.3. Atividade de biosurfactantes	78
5.1.6. Decaciclono	82
5.1.6.1. Crescimento das linhagens em decaciclono	82
5.1.6.2. Determinação das atividades de enzimas ligninolíticas	84
5.1.6.3. Atividade de biosurfactantes	85
5.1.7. Ácido Lignosulfônico	89

5.1.7.1.Crescimento das linhagens em AL	89
5.1.7.2.Determinação das atividades de enzimas ligninolíticas	91
5.1.8. Ácido Tânico	94
5.1.8.1.Crescimento das linhagens em AT	94
5.1.8.2.Determinação das atividades de enzimas ligninolíticas	96
5.2. Seleção das linhagens crescidas sob condição microaeróbia	98
<u>PARTE II :</u>	
5.3. Condição anaeróbia	99
5.3.1. Crescimento das linhagens selecionadas	99
5.3.2.Atividade das enzimas ligninolíticas e biosurfactantes (HAPs)	101
5.3.2.1. Naftaleno	101
5.3.2.2. Fenantreno	103
5.3.2.3. Criseno	105
5.3.2.4. Perileno	107
5.3.2.5. Naftol [2,3-a] pireno	109
5.3.2.6. Decaciclono	111
5.3.3. Atividade das enzimas ligninolíticas (AL e AT)	113
5.3.3.1. Ácido Lignosulfônico	113
5.3.3.2. Ácido Tânico	114
<u>PARTE III :</u>	
5.4. Degradação dos HAPs e outros compostos similares à lignina e comparação das atividades enzimáticas sob condições micro e anaeróbia.	115
5.4.1. Naftaleno	115
5.4.2. Fenantreno	120
5.4.3. Criseno	124
5.4.4. Perileno	127
5.4.5. Naftol [2,3-a] pireno	130
5.4.6. Decaciclono	133
5.4.7. Ácido Lignosulfônico	136

5.4.8. Ácido Tânico	139
6. CONCLUSÕES	145
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	147
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1: Estrutura química dos Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos. .	02
FIGURA 2: Representação esquemática da ocorrência dos HAPs no ambiente	04
FIGURA 3: Rotas metabólicas de degradação de HAPs por bactérias e fungos em sistema aeróbio	08
FIGURA 4: Estrutura química provável da Lignina	12
FIGURA 5: Estrutura química do Ácido Lignosulfônico	14
FIGURA 6a: Estrutura química do Ácido Tânico; 6b: Tanino hidrolisável . . .	15
FIGURA 7: Rota de degradação de um trihidroxibenzenóide (subestrutura do AT) sob condição anaeróbia no rúmen de herbívoros.	17
FIGURA 8: Ciclo catalítico da Lignina-peroxidase.	21
FIGURA 9: Ciclo catalítico da Manganês-peroxidase.	23
FIGURA 10: Mecanismo de oxidação proposta para Lacase.	26
FIGURA 11: Mecanismo de atuação da Tirosinase.	27
FIGURA 12a: Substratos utilizados pela enzima aril-álcool-oxidase de <i>Pleurotus</i> ; 12b: Produção de peróxido de hidrogênio com reciclagem dos compostos pelas aril-álcool-desidrogenases intracelulares.	28
FIGURA 13: Degradação anaeróbia de alguns compostos polifenólicos provenientes, anteriormente, de compostos poliaromáticos.	32
FIGURA 14a: Biotransformação anaeróbia de compostos poliaromáticos via Benzoil-CoA; 14b: Rota de degradação do Benzoil-CoA.	33
FIGURA 15a: Formação de emulsão óleo/água e 15b: formação de emulsão água/óleo por microrganismos.	42
FIGURA 16: Atividades das enzimas LiP, MnP, peroxidase (U/L.min) e porcentagens de degradações do <i>naftaleno</i> , em 30 dias, sob condições microaeróbia e anaeróbia.	117
FIGURA 17: Atividades das enzimas lacase, tirosinase (U/L.min) e porcentagens de degradações do <i>naftaleno</i> , em 30 dias, sob condições	

microaeróbia e anaeróbia.	117
FIGURA 18: Cromatograma da linhagem 984 crescida em naftaleno, 30 dias, sob condição microaeróbia.	118
FIGURA 19: Cromatograma da linhagem H2 crescida em naftaleno, 30 dias, sob condição microaeróbia.	118
FIGURA 20: Cromatograma da linhagem H2 crescida em naftaleno, 30 dias, sob condição anaeróbia.	119
FIGURA 21: Atividades das enzimas LiP, MnP, peroxidase (U/L.min) e porcentagens de degradações do <i>fenantreno</i> , em 30 dias, sob condições microaeróbia e anaeróbia.	121
FIGURA 22: Atividades das enzimas lacase, tirosinase (U/L.min) e porcentagens de degradações do <i>fenantreno</i> , em 30 dias, sob condições microaeróbia e anaeróbia.	121
FIGURA 23: Cromatograma da linhagem 984 crescida em fenantreno, 30 dias, sob condição microaeróbia.	122
FIGURA 24: Cromatograma da linhagem Q10 crescida em fenantreno, 30 dias, sob condição microaeróbia.	122
FIGURA 25: Cromatograma da linhagem FUS crescida em fenantreno, 30 dias, sob condição anaeróbia.	123
FIGURA 26: Cromatograma da linhagem Q10 crescida em fenantreno, 30 dias, sob condição anaeróbia.	123
FIGURA 27: Atividades das enzimas LiP, MnP, peroxidase (U/L.min) e porcentagens de degradações do <i>criseno</i> , em 30 dias, sob condições microaeróbia e anaeróbia.	125
FIGURA 28 : Atividades das enzimas lacase, tirosinase (U/L.min) e porcentagens de degradações do <i>criseno</i> , em 30 dias, sob condições microaeróbia e anaeróbia.	125
FIGURA 29: Cromatograma linhagem Q10 crescida em criseno, 30 dias, sob condição microaeróbia.	126
FIGURA 30: Cromatograma da linhagem 20 crescida em criseno, 30 dias, sob condição anaeróbia.	126

FIGURA 31: Atividades das enzimas LiP, MnP, peroxidase (U/L.min) e porcentagens de degradações do <i>perileno</i> , em 30 dias, sob condições microaeróbia e anaeróbia	128
FIGURA 32: Atividades das enzimas lacase, tirosinase (U/L.min) e porcentagens de degradações do <i>perileno</i> , em 30 dias, sob condições microaeróbia e anaeróbia	128
FIGURA 33: Cromatograma da linhagem H2 crescida em <i>perileno</i> , 30 dias, sob condição microaeróbia.	129
FIGURA 34: Cromatograma da linhagem Q10 crescida em <i>perileno</i> , 30 dias, sob condição anaeróbia.	129
FIGURA 35: Atividades das enzimas LiP, peroxidase, lacase, tirosinase (U/L.min) e porcentagens de degradações do <i>naftol [2,3-a] pireno</i> , em 30 dias, sob condições microaeróbia e anaeróbia	131
FIGURA 36: Atividades da enzima MnP (U/L.min) e porcentagens de degradações do <i>naftol [2,3-a] pireno</i> , em 30 dias, sob condições microaeróbia e anaeróbia	131
FIGURA 37: Cromatograma da linhagem 1040 crescida em <i>naftol [2,3-a] pireno</i> , 30 dias, sob condição microaeróbia.	132
FIGURA 38: Cromatograma da linhagem H2 crescida em <i>naftol [2,3-a] pireno</i> , 30 dias, sob condição anaeróbia.	132
FIGURA 39: Atividades das enzimas LiP, peroxidase (U/L.min) e porcentagens de degradações do <i>decaciclono</i> , em 30 dias, sob condições microaeróbia e anaeróbia.	133
FIGURA 40: Atividades das enzimas lacase, tirosinase (U/L.min) e porcentagens de degradações do <i>decaciclono</i> , em 30 dias, sob condições microaeróbia e anaeróbia.	134
FIGURA 41: Atividades da enzima MnP (U/L.min) e porcentagens de degradações do <i>decaciclono</i> , em 30 dias, sob condições micro e anaeróbias.	134
FIGURA 42: Cromatograma da linhagem 984 crescida em <i>decaciclono</i> , 30 dias, sob condição microaeróbia.	135

FIGURA 43: Cromatograma da linhagem Q10 crescida em decaciclono, 30 dias, sob condição anaeróbia.	135
FIGURA 44: Atividades das enzimas LiP, MnP (U/L.min) e porcentagens de degradações do <i>ácido lignosulfônico</i> , em 30 dias, sob condições microaeróbia e anaeróbia.	137
FIGURA 45: Atividades das enzimas peroxidase, lacase (U/L.min) e porcentagens de degradações do <i>ácido lignosulfônico</i> , em 30 dias, sob condições microaeróbia e anaeróbia	137
FIGURA 46: Cromatogramas das linhagens 1040 e 984 crescidas em ácido lignosulfônico, 30 dias, sob condição microaeróbia.	138
FIGURA 47: Cromatograma da linhagem 20 crescida em ácido lignosulfônico, 30 dias, sob condição anaeróbia.	138
FIGURA 48: Atividades das enzimas LiP, MnP (U/L.min) e porcentagens de degradações do <i>ácido tânico</i> , em 30 dias, sob condições microaeróbia e anaeróbia.	140
FIGURA 49: Atividades das enzimas peroxidase, lacase (U/L.min) e porcentagens de degradações do <i>ácido tânico</i> , em 30 dias, sob condições microaeróbia e anaeróbia.	140
FIGURA 50: Cromatograma da linhagem 801 crescida em ácido tânico, 30 dias, como sob condição microaeróbia.	141
FIGURA 51: Cromatograma da linhagem Q10 crescida em ácido tânico, 30 dias, sob condição microaeróbia.	141

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1: Composição do Meio Líquido Básico por Litro	37
TABELA 2: Crescimento das linhagens em <i>naftaleno</i> 0,5% (m/v), sob condição microaeróbia.	47
TABELA 3: Valores das atividades enzimáticas (U/L.min) de LiP, MnP e peroxidase produzidas pelas linhagens em <i>naftaleno</i> , sob condição microaeróbia.	51
TABELA 4: Valores das atividades enzimáticas (U/L.min) das fenoloxidasas lacase e tirosinase, produzidas pelas linhagens em <i>naftaleno</i> , sob condição microaeróbia.	52
TABELA 5: Emulsões óleo/água (Abs.) e água/óleo (Halo) produzidas pelas linhagens crescidas em <i>naftaleno</i> , sob condição microaeróbia	53
TABELA 6: Crescimento das linhagens em <i>fenantreno</i> 0,5% (m/v), sob condição microaeróbia.	54
TABELA 7: Valores das atividades enzimáticas (U/L.min) de LiP, MnP e peroxidase produzidas pelas linhagens em <i>fenantreno</i> , sob condição microaeróbia.	58
TABELA 8: Valores das atividades enzimáticas (U/L.min) das fenoloxidasas lacase e tirosinase, produzidas pelas linhagens em <i>fenantreno</i> , sob condição microaeróbia.	59
TABELA 9: Emulsões óleo/água (Abs.) e água/óleo (Halo) produzidas pelas linhagens crescidas em <i>fenantreno</i> , sob condição microaeróbia	60
TABELA 10: Crescimento das linhagens em <i>criseno</i> 0,05% (m/v), sob condição microaeróbia.	61
TABELA 11: Valores das atividades enzimáticas (U/L.min) de LiP, MnP e peroxidase produzidas pelas linhagens em <i>criseno</i> , sob condição microaeróbia.	65
TABELA 12: Valores das atividades enzimáticas (U/L.min) das fenoloxidasas lacase e tirosinase, produzidas pelas linhagens em <i>criseno</i> ,	

sob condição microaeróbia.	66
TABELA 13: Emulsões óleo/água (Abs.) e água/óleo (Halo) produzidas pelas linhagens crescidas em <i>criseno</i> , sob condição microaeróbia	67
TABELA 14: Crescimento das linhagens em <i>perileno</i> 0,05% (m/v), sob condição microaeróbia.	68
TABELA 15: Valores das atividades enzimáticas (U/L.min) de LiP, MnP e peroxidase produzidas pelas linhagens em <i>perileno</i> , sob condição microaeróbia	72
TABELA 16: Valores das atividades enzimáticas (U/L.min) das fenoloxidasas lacase e tirosinase, produzidas pelas linhagens em <i>perileno</i> , sob condição microaeróbia.	73
TABELA 17: Emulsões óleo/água (Abs.) e água/óleo (Halo) produzidas pelas linhagens crescidas em <i>perileno</i> , sob condição microaeróbia	74
TABELA 18: Crescimento das linhagens em <i>naftol[2,3-a]pireno</i> 0,05% (m/v), sob condição microaeróbia.	75
TABELA 19: Valores das atividades enzimáticas (U/L.min) de LiP, MnP e peroxidase produzidas pelas linhagens em <i>naftol[2,3-a]pireno</i> , sob condição microaeróbia.	79
TABELA 20: Valores das atividades enzimáticas (U/L.min) das fenoloxidasas lacase e tirosinase, produzidas pelas linhagens em <i>naftol[2,3-a]pireno</i> , sob condição microaeróbia.	80
TABELA 21: Emulsões óleo/água (Abs.) e água/óleo (Halo) produzidas pelas linhagens crescidas em <i>naftol[2,3-a]pireno</i> , sob condição microaeróbia	81
TABELA 22: Crescimento das linhagens em <i>decaciclono</i> 0,05% (m/v), sob condição microaeróbia.	82
TABELA 23: Valores das atividades enzimáticas (U/L.min) de LiP, MnP e peroxidase produzidas pelas linhagens em <i>decaciclono</i> , sob condição microaeróbia.	86
TABELA 24: Valores das atividades enzimáticas (U/L.min) das fenoloxidasas lacase e tirosinase, produzidas pelas linhagens em <i>decaciclono</i> , sob condição microaeróbia.	87

TABELA 25: Emulsões óleo/água (Abs.) e água/óleo (Halo) produzidas pelas linhagens crescidas em <i>decaciclono</i> , sob condição microaeróbia	88
TABELA 26: Crescimento das linhagens em <i>ácido lignosulfônico</i> 0,2% (m/v), sob condição microaeróbia.	89
TABELA 27: Valores das atividades enzimáticas (U/L.min) de LiP, MnP, peroxidase e lacase, produzidas pelas linhagens em AL, sob condição microaeróbia.	93
TABELA 28: Crescimento das linhagens em <i>ácido tânico</i> 0,2% (m/v), sob condição microaeróbia.	94
TABELA 29: Valores das atividades enzimáticas (U/L.min) de LiP, MnP, peroxidase e lacase, produzidas pelas linhagens em AT, sob condição microaeróbia.	97
TABELA 30: Linhagens selecionadas quanto aos melhores crescimentos no período de 30 dias de cultivo, sob condição microaeróbia	98
TABELA 31: Crescimento sob condição anaeróbia das linhagens selecionadas	100
TABELA 32: Atividades enzimáticas (U/L.min) e produção de biosurfactantes (emulsões O/A e A/O) pelas linhagens em <i>naftaleno</i> 0,5% (m/v), sob condição anaeróbia.	102
TABELA 33: Atividades enzimáticas (U/L.min) e produção de biosurfactantes (emulsões O/A e A/O) pelas linhagens em <i>fenantreno</i> 0,5% (m/v), sob condição anaeróbia.	104
TABELA 34: Atividades enzimáticas (U/L.min) e produção de biosurfactantes (emulsões O/A e A/O) pelas linhagens em <i>criseno</i> 0,05% (m/v), sob condição anaeróbia.	106
TABELA 35: Atividades enzimáticas (U/L.min) e produção de biosurfactantes (emulsões O/A e A/O) pelas linhagens em <i>perileno</i> 0,05% (m/v), sob condição anaeróbia.	108
TABELA 36: Atividades enzimáticas (U/L.min) e produção de biosurfactantes (emulsões O/A e A/O) pelas linhagens em <i>naftol[2,3-a]pireno</i> 0,05% (m/v), sob condição anaeróbia.	110

TABELA 37: Atividades enzimáticas (U/L.min) e produção de biosurfactantes (emulsões O/A e A/O) pelas linhagens em <i>decaciclono</i> 0,05% (m/v), sob condição anaeróbia.	112
TABELA 38: Atividades enzimáticas (U/L.min) produzidas pelas linhagens em <i>ácido lignosulfônico</i> 0,2% (m/v), sob condição anaeróbia.	113
TABELA 39: Atividades enzimáticas (U/L.min) produzidas pelas linhagens em <i>ácido tânico</i> 0,2% (m/v), sob condição anaeróbia.	114

RESUMO

As atividades industriais da sociedade moderna vêm produzindo grande quantidade de compostos poluentes tóxicos e persistentes nas águas e solos, acarretando desequilíbrio dos ecossistemas.

A degradação de xenobióticos recalcitrantes por fungos, principalmente os de degradação branca, tem sido uma alternativa viável de biorremediação ambiental devido à produção de um sistema enzimático extracelular e não-específico por estes fungos. As enzimas ligninolíticas são capazes de atuarem na degradação da lignina e de vários compostos orgânicos xenobióticos poliaromáticos e com estruturas similares à molécula da lignina. Para uma eficiência na biotransformação e conseqüente mineralização dos compostos poluentes, os microrganismos podem produzir biosurfactantes responsáveis pela maior solubilização de moléculas recalcitrantes no meio, aumentando a superfície de contato entre poluentes e microrganismos, facilitando assim a disponibilidade a biodegradação.

Neste trabalho, várias linhagens fúngicas foram capazes de crescer em hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), ácido lignosulfônico e ácido tânico como fontes de carbono e produzirem enzimas ligninolíticas e biosurfactantes sob condições microaeróbia e anaeróbia. Tais compostos de difícil mineralização e resistentes as biotransformações foram degradados, parcialmente, pelos fungos estudados e a porcentagem de degradação apresentou variação de acordo com a linhagem, fonte de carbono utilizada e a condição de oxigenação.

Em condição microaeróbia, os fungos 984, 1040, Q10 e 710 destacaram-se na degradação de compostos poliaromáticos. As melhores degradações foram apresentadas para decaciclono (10 anéis – 20-40%) e perileno (5 anéis – 11-40%) em relação aos HAPs de maiores massas molares. A degradação do naftaleno (2 anéis) foi maior do que fenantreno (3 anéis).

Na condição anaeróbia, verificaram-se degradações para todas as fontes de carbono estudadas, exceto ácido tânico. Nesta condição, os fungos Q10, H2 e 710 apresentaram maior capacidade de degradação para a maioria das fontes de carbono estudadas. Em ambas as condições, a linhagem 984 apresentou maior produção de biosurfactante na presença de todos os HAPs testados.

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e outros compostos orgânicos recalcitrantes podem ser degradados sob condições microaeróbia e anaeróbia por fungos, auxiliando assim na biorremediação de locais contaminados de difícil despoluição pela ausência de oxigênio.

SUMMARY

The industrial activities of modern society produce great amounts of toxic compounds, which persist in rivers, soils and oceans, causing disturbance to ecosystems.

Owing to an extracellular and non-specific enzymatic system produced by white-rot fungi, degradation of these xenobióticos became a viable alternative for environmental bioremediation. Such ligninolytic enzymes are able to degrade lignin and most organic and xenobiotic polyaromatic compounds and macromolecules with complex links similar to those found in lignin. For the efficient biotransformation and consequent mineralization of pollutant compounds, microorganisms can produce biosurfactants, which are responsible for solubilization of the recalcitrant molecules, increasing surface contact between pollutant and microorganism, and thus increasing proneness to biodegradation.

In this work, non-basidiomycete fungi were grown on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), lignosulphonic acid and tannic acid as carbon sources and were able to produce ligninolytic enzymes, and biosurfactants, under microaerobic and anaerobic conditions. These compounds were partially degraded by the fungi and the percentage of degradation varied depending on the fungal strain, carbon source and oxygenation condition.

Under microaerobic conditions, the fungal strains 984, 1040, Q10 and 710 were the best degraders of PAHs, where decacyclene (ten rings) was degraded from 20 to 40% and perylene (five rings) 11 to 40%.

Under anaerobic conditions, there was degradation of all the carbon sources except tannic acid. Fungi Q10, H2 e 710 showed the best degradations for the majority of carbon sources. Under both conditions, strain 984 showed great production of biosurfactant emulsions when grown in PAHs.

Polycyclic aromatic hydrocarbons and others recalcitrant organic pollutants can be degraded by fungi under microaerobic and anaerobic conditions, and thereby aid in the bioremediation of anoxic environments.

1. INTRODUÇÃO

Em decorrência da crescente urbanização, o desenvolvimento industrial e várias atividades antropogênicas exploratórias do ambiente foram as principais razões de contaminações dos solos, do ar, sedimentos, das águas superficiais e subterrâneas por compostos químicos tóxicos e perigosos à saúde.

A redução da toxicidade e da concentração dos poluentes ambientais pelo uso de processos envolvendo microrganismos vem sendo estudada há algumas décadas como processo alternativo aos tratamentos químicos e que dispendem muita energia (BOOPATHY, 2000).

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são poluentes causadores de contaminação em vários ambientes do ecossistema, principalmente nos sedimentos e em locais de baixa oxigenação. Fungos degradadores da lignina, principalmente os de degradação branca (white-rot fungi) são potenciais biotransformadores de HAPs e de uma grande variedade de compostos xenobióticos tóxicos através da atuação de um sistema de óxido-redução de enzimas ligninolíticas (LEE, 1997), cuja inespecificidade determina a eliminação de inúmeros compostos poliaromáticos e macromoléculas complexas similares à estrutura da lignina (CAMERON & AUST, 2000).

A degradação destes poluentes aromáticos por microrganismos é, preferencialmente, aeróbia devido a maior produção de energia neste processo (McRAE *et al.*, 1998). Além disso, o uso do oxigênio molecular é importante para a clivagem de estruturas de compostos aromáticos (HARWOOD *et al.*, 1999).

A biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos pode ocorrer tanto em condições microaeróbia como anaeróbia; porém, em níveis menores comparados com a condição de oxigenação, havendo uma tendência à acumulação e persistência dos compostos nestes ambientes (JOHNSON & GHOSH, 1998). Porém, processos anaeróbios de descontaminação têm-se mostrado eficientes para a utilização em ambientes anóxicos e com baixa oxigenação (COATES & ANDERSON, 2000).

O interesse de se estudar a capacidade de biodegradação de poluentes recalcitrantes e tóxicos em tais ambientes é de grande importância para a descontaminação de áreas de difícil biorremediação devido à ausência de oxigênio.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs)

Os HAPs são compostos formados por anéis benzênicos arranjados em formas lineares, angulares ou em grupos (Figura 1), encontrados nos solos, sedimentos e nas águas (CERNIGLIA, 1992).

São produzidos pela queima incompleta de combustíveis fósseis e por processos industriais (como torrefação de grãos, defumações e incinerações), encontrados ainda em efluentes industriais, derramamentos de petróleo ou em explosões acidentais de combustíveis durante o transporte.

Estão também presentes em locais de lavoura e florestas que sofreram queimadas. Constituem risco à saúde das pessoas que habitam áreas industrializadas pela maior exposição de poluição atmosférica por estes compostos, sendo expelidos de chaminés industriais e escapamentos de automóveis, estando também presentes na fumaça de cigarros, cinzas vulcânicas e incineradores (MÜNCNEROVÁ & AUGUSTIN, 1994).

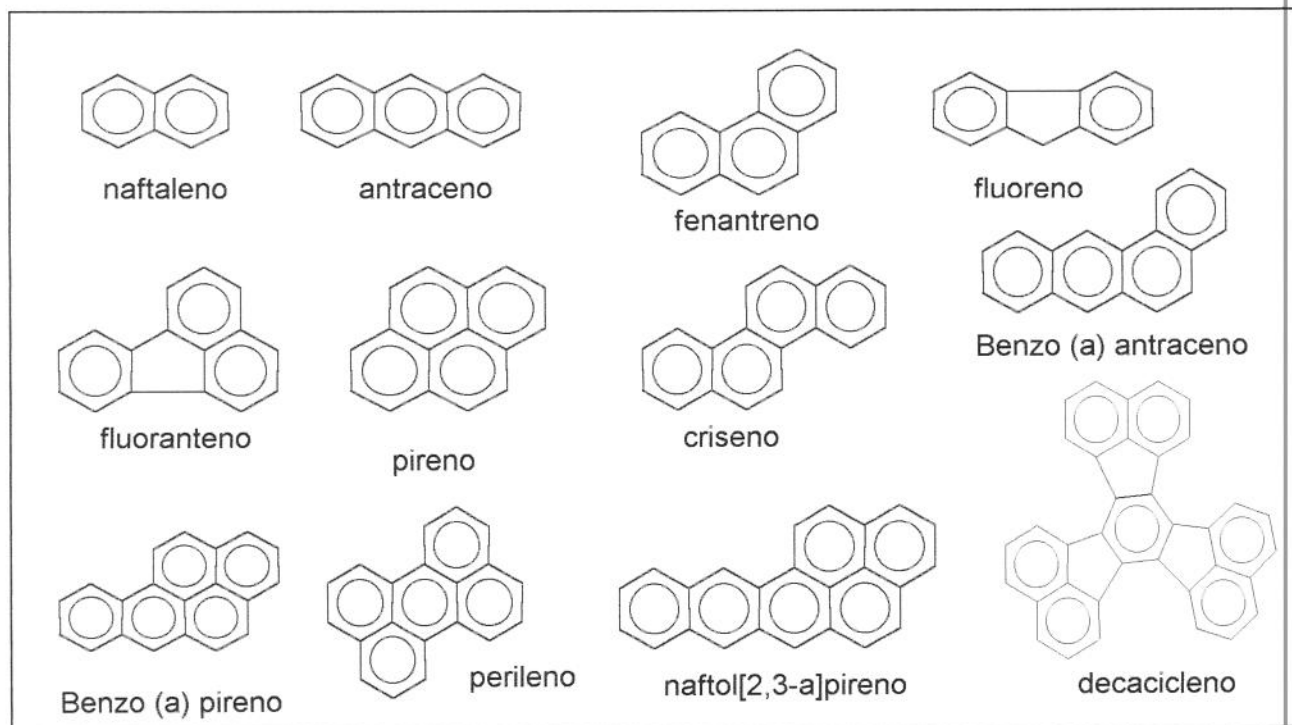


Figura 1 – Estruturas químicas dos Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (ALDRICH®).

Estudos epidemiológicos apontam uma associação direta entre a poluição atmosférica por HAPs com as doenças cardiopulmonares e o câncer de pulmão (RICHTER & HOWARD, 2000). A lipofobicidade, persistência no ambiente e genotoxicidade destas substâncias aumentam de acordo com o acréscimo de anéis benzênicos na molécula (CERNIGLIA, 1992).

Muitos HAPs presentes no ambiente, principalmente os de maiores massas molares, são considerados pró-carcinogênicos por ativação metabólica no organismo ((KIEHLMANN *et al.*, 1996) e mutagênicos (LIAO & TSENG, 1996; BIDAUD & TRAN-MINH, 1998) . De acordo com BOONCHAN *et al.* (2000), os HAPs com menor número de anéis benzênicos possuem propriedade tóxica aguda, alterando o nível de reprodutividade e aumentando a mortalidade de animais marinhos.

2.1.1. Formação dos HAPs

Na queima da matéria orgânica e de combustíveis alifáticos e aromáticos (entre 500° a 900° C), as frações livres e instáveis provenientes da pirólise se polimerizam pela ação de radicais livres ($-C_2H$) formados neste processo, formando moléculas de poliacetileno e HAPs pelas fusões dos anéis benzênicos estáveis, processo este chamado de pirossíntese (RICHTER & HOWARD, 2000).

Em condições anaeróbias, precursores orgânicos desconhecidos contribuíram para a formação de HAPs com média massa molar como perileno (SILLIMAN *et al.*, 1998). Hidroquinonas provenientes de pigmentos de animais marinhos, insetos e fungos possivelmente podem ser também precursores de HAPs.

A difusão dos HAPs no ambiente (Figura 2) pode ocorrer por volatilização, foto-oxidação e oxidações químicas, bioacumulação nos organismos, por adsorção nas partículas do solo (YUAN *et al.*, 2000), dando início ao processo de acúmulo na cadeia alimentar.

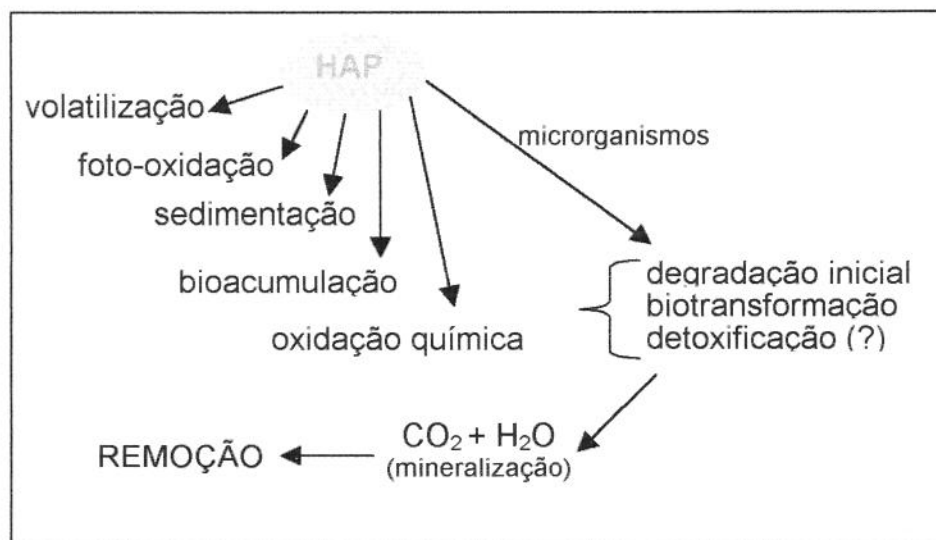


Figura 2 - Representação esquemática da ocorrência dos HAPs no ambiente (CERNIGLIA, 1992).

2.1.2. Transporte dos HAPs nos ecossistemas

Ao longo dos milhares de anos, em ambiente anóxicos, HAPs foram se depositando nos sedimentos de lagos e oceanos. Mesmo os de menores massas molares puderam resistir à biodegradação devido à proteção física pela adsorção em materiais orgânicos do solo (TEN HULSCHER, 1999).

A solubilidade dos HAPs em água pode aumentar devido a presença de matéria orgânica dissolvida no solo: quanto maior a massa molar do HAP, maior também será a tendência de adsorção (KIM *et al.*, 1999). Portanto, o transporte de HAPs com matéria orgânica ocorre no ambiente, especialmente para os de maiores massas molares. Porém, a matéria orgânica pode se estabilizar por desprotonação dos seus grupos funcionais devido ao aumento de pH no solo, dificultando a adsorção dos HAPs (GOCHT *et al.*, 2001).

De acordo com PIGNATELLO & XING (1996), a ligação de poluentes orgânicos à matéria húmica do solo é realizada por forças de interação (dipolo-dipolo, dipolo-induzido, pontes de hidrogênio). Vários microrganismos do solo, principalmente os fungos, produzem enzimas extracelulares oxiredutases (peroxidases e polifenoloxidasas) capazes de detoxificar estes compostos no ecossistema (BOLLAG, 1992).

2.1.3. HAPs em alimentos

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos ocorrem como contaminantes em diferentes grupos de alimentos: vegetais, frutas, carnes, óleos e gorduras, bebidas, grãos, alimentos defumados, torrados e de origem marinha (BARTLE, 1991). São provenientes de defumações, secagens, torrefações, cozimentos, embalagens e ainda, da poluição ambiental.

O consumo de HAPs através da dieta tem sido largamente pesquisado nas últimas duas décadas, sendo que as principais fontes de exposição variam de acordo com a cultura gastronômica de cada país (LODOVICI *et al.*, 1995).

Em alimentos defumados, a combustão incompleta da madeira gera grande quantidade de HAPs; nos grelhados, a gordura da carne ao pingar no fogo é pirolisada e agrega HAPs gerados pela queima do carvão (NOLL & TOLEDO, 1997). As frutas e vegetais são contaminados pelos HAPs provenientes do ar por impregnação superficial nas folhas e frutos (COATES *et al.*, 1986), e através do solo, pela adsorção das raízes.

O nível de HAPs nos solos e no ar depende da localização das áreas de cultivo: regiões muito industrializadas e próximas à rodovias fornecem amostras com maiores quantidades de HAPs do que aquelas situadas nas zonas rurais (McRAE & HALL, 1998).

Os cereais são contaminados através da secagem dos grãos utilizando óleo como combustível, podendo transferi-los para a farinha pela moagem. Devido a propriedade lipofílica dos HAPs, os óleos e gorduras podem ser facilmente contaminados por esses compostos (MORET & CONTE, 2000).

Bebidas como café são contaminadas durante o processo de torrefação dos grãos e 20-30% destes HAPs são transferidos para o pó. Com relação aos chás, embora apresentem níveis mais elevados de HAPs que o café torrado, apenas uma pequena parte é transferida para a bebida após o processo de infusão (KRUIJF *et al.*, 1987).

Os HAPs, embora tenham baixa solubilidade em água, ficam adsorvidos em partículas suspensas ou em sedimentos (FERNANDEZ *et al.*, 1996). No Brasil,

estabeleceu-se um limite máximo de 0,01 µg/L de benzo(a)pireno em águas potáveis (CAMARGO, 2000).

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA), mais de 100 HAPs já foram caracterizados na natureza e 16 foram classificados como poluentes prioritários (KORNMÜLLER & WIESMANN, 1999); no entanto, não existem limites de ocorrência de cada um dos HAPs carcinogênicos nos diferentes produtos alimentícios (CHEN *et al*, 1996).

Poucos países apresentam legislação nacional limitando a presença destes compostos nos alimentos. Alguns países europeus como Alemanha, Áustria e Polônia adotam um limite legal de 1 µg de benzo(a)pireno por quilo de carnes defumadas e este valor foi utilizado como referência para avaliar contaminações destes compostos em outros tipos de alimentos.

Considerando-se que os produtos defumados são utilizados em menor quantidade na dieta alimentar que os óleos e gorduras, a GSFS (Germany Society for Fat Science) fixou limite de 5 ppb de HAPs totais para esses alimentos (MORET & CONTE, 2000).

No Brasil, a legislação recomenda que os alimentos aromatizados com fumaça não ultrapassem 0,03 ppb de benzo(a)pireno no produto final, de acordo com a resolução 104/93 do regulamento técnico de aditivos aromatizados (CAMARGO, 2000). De acordo com esta mesma autora, níveis de vários HAPs foram verificados nos alimentos pertencentes à dieta dos brasileiros. A ingestão total de HAPs foi estimada em 6,15 µg/pessoa/dia, sendo os óleos e gorduras, açúcares e carnes os três grupos de alimentos que mais contribuem para a ingestão diária de HAPs. Em vegetais e frutas foram encontrados, diariamente, aproximadamente 4,0 µg de HAPs totais por pessoa. Para os óleos e gorduras: 32,9 µg de HAPs totais/pessoa. Em açúcares foram verificados 15,44 µg de HAPs/pessoa; em chá foi determinado uma concentração de 0,7 µg de HAPs totais/pessoa; e em pó de café 20,0 µg de HAPs/pessoa; porém, no café coado, apenas 3,0 µg de HAPs/pessoa foi consumido na bebida (CAMARGO, 2000).

2.1.4. Degradação dos Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

Os HAPs são compostos de baixa solubilidade em água, associando-se a sedimentos e permanecendo assim até sua degradação ou remoção por drenagem e, geralmente, a taxa de degradação de HAPs é inversamente proporcional ao número de anéis benzênicos em suas moléculas (CERNIGLIA, 1992). HAPs de baixa massa molar como naftaleno e fenantreno são degradados rapidamente nos sedimentos, enquanto HAPs de maiores massas molares como benzo(a)pireno são mais resistentes ao ataque microbiano.

Há pouco conhecimento sobre a capacidade de fungos e bactérias em degradarem HAPs de alta massa molar como única fonte de carbono e energia. Sabe-se que a presença de O₂ é importante para a iniciação da oxidação enzimática dos anéis aromáticos (CERNIGLIA & HEITKAMP, 1989).

Os solos de florestas, devido a uma grande diversidade de espécies vegetais, abrigam maior quantidade de decompositores comparado com solos de monocultura. A mistura de materiais em decomposição de diferentes espécies vegetais tem mostrado decomposição mais rápida pela ação de bactérias e fungos, potencializando a degradação de lignina, celulose e de poluentes orgânicos persistentes (HOWARD, 1998). A habilidade da degradação dos fungos neste ambiente, geralmente aumenta, bem como a taxa de mineralização e compostos pela diversidade de comunidade microbiana (CASELLA *et al.*, 1998). Microrganismos capazes de degradar substâncias húmicas são responsáveis pela degradação cometabólica dos HAPs (KÄSTNER & MAHRO, 1996).

Os fatores ambientais que determinam os níveis de degradação dos HAPs no ecossistema são: temperatura, pH, concentração de oxigênio, salinidade, intensidade luminosa, tipo de solo e sua profundidade, nutrientes, sazonalidade, adaptação microbiana e ainda características físico-químicos dos poluentes, os quais incluem a solubilidade em água, grau de lipofilicidade, volatilidade e absorção pelas partículas do solo (CERNIGLIA, 1992).

As bactérias, em presença de oxigênio, transformam núcleos aromáticos em cis-diidrodióis e catecóis, pela ação de dioxigenases e dehidrogenases,

respectivamente, como esquematizado na Figura 3 (MÜNCNEROVÁ & AUGUSTIN, 1994; GALLI, 1994).

Diversos fungos ligninolíticos e não-ligninolíticos possuem a habilidade de oxidarem HAPs: *Aspergillus ochraceus*, *Cunningamella elegans* e *C. echinulata*, *Bjerkandera* sp, *Trametes versicolor* e *Saccharomyces cerevisiae* (MÜNCNEROVÁ & AUGUSTIN, 1994); *Candida lypolitica* e *Cunningamella elegans* (ROMERO *et al.*, 1998) são alguns deles, hábeis na transformação dos HAPs em produtos menos tóxicos. *Phanerochaete chrysosporium* realiza a mineralização de benzo (a) pireno cometabolicamente (CERNIGLIA, 1992).

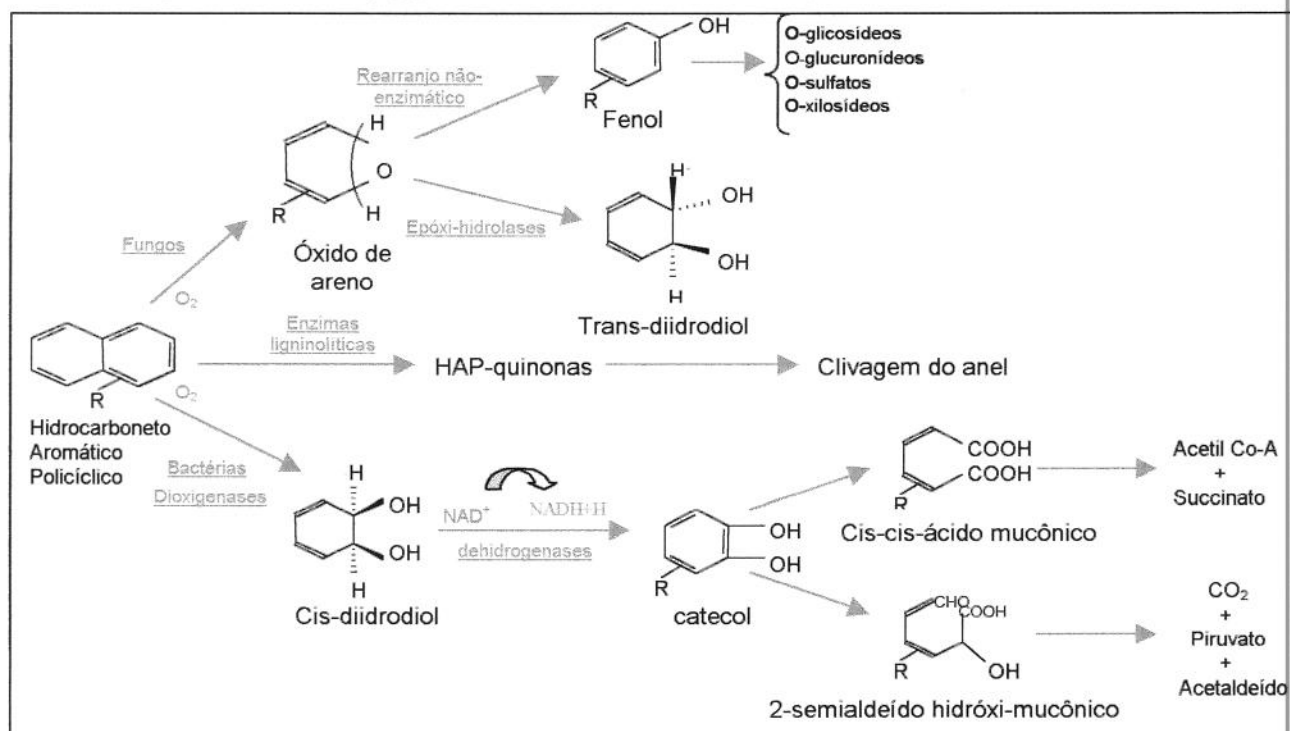


Figura 3 – Rotas metabólicas da degradação de HAPs por bactérias e fungos em sistema aeróbio (MÜNCNEROVÁ & AUGUSTIN, 1994 com adaptação de GALLI, 1994).

Os fungos filamentosos oxidam HAPs em sistema aeróbio (Figura 3), à óxido de areno via citocromo P-450, o qual pode ser transformado em fenóis por rearranjos não-enzimáticos ou ainda em trans-diidrodióis pela ação de epoxidihidrolases; e à cetonas e quinonas através da ação de peroxidases e fenoloxidasas fúngicas (CERNIGLIA, 1992 e 1997; WISCHMANN & STEINHART, 1997; MAJCHERCZYK *et al.*, 1998).

CANET e colaboradores (2001), não obtiveram degradações significativas de HAPs em experimentos utilizando a fauna natural do solo contaminado e com adição de fungos de degradação branca. Porém, em trabalho realizado por BOONCHAN e colaboradores (2000), foi demonstrado que coculturas de bactérias e algumas espécies de fungos podem realizar uma metabolização cooperativa dos HAPs, sendo de prática aplicação em processos de biorremediação.

Os fungos de *decomposição branca* são capazes de degradar HAPs e possuem grande potencial na biorremediação de solos e sedimentos contaminados (PICKARD *et al.* 1999; NOVOTNY *et al.*, 1999; ANDERSSON *et al.*, 2000).

2.2. Biosurfactantes : seu papel na biodegradação

Os biosurfactantes são moléculas anfipáticas que possuem uma fração hidrofóbica apolar (normalmente cadeias hidrocarbônicas de ácidos graxos) e outra hidrofílica e polar (composta por grupos funcionais éster e álcoois, grupo carboxílico dos ácidos graxos ou aminoácidos, fosfato dos fosfolipídeos, carboidratos entre outros). Uma grande variedade de bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem crescer em meios contendo compostos hidrofóbicos (como os hidrocarbonetos), como única fonte de carbono e energia, devido à produção de agentes emulsificantes (BRODERICK & COONEY, 1981 e LANG & WAGNER, 1987).

Devido a natureza hidrofóbica dos HAPs e outros poluentes poliaromáticos nos ecossistemas aquáticos e terrestres, estes compostos tendem a se acumularem na cadeia alimentar (BOONCHAN *et al.*, 2000), encontrando-se dispersos em emulsões óleo/água ou na matéria orgânica hidrofóbica (KORNMÜLLER & WIESMANN, 1999).

Os biosurfactantes, então, tendem a aumentar a biodegradação de xenobióticos, uma vez que podem solubilizar e emulsificar os compostos

insolúveis e recalcitrantes, aumentando assim a área de superfície de interação e a concentração aquosa, tornando mais fácil a acessibilidade para o microrganismo (ROUSE, 1994; BOYLE *et al.*, 1997). Quando em emulsão, estas moléculas tendem a se agregarem formando micelas, sendo capazes de reduzirem a tensão superficial com a formação de microemulsões óleo em água ou água em óleo (DESAI & BANAT, 1997).

Alguns biosurfactantes são produzidos no período de crescimento celular, sugerindo seus envolvimento com o crescimento do microrganismo em meio contendo hidrocarbonetos. BRODERICK & COONEY (1981) demonstram em seu trabalho que o poder de emulsificação do surfactante tem sido observado no metabolismo secundário (fase estacionária), podendo ser o biosurfactante um metabólito secundário ou originado pela lise celular. Sob limitação de nitrogênio e alguns cátions, a produção destas moléculas é induzida (SYLDATK & WAGNER, 1987).

O uso de surfactantes sintéticos para a biorremediação dos solos pode acarretar problemas como toxicidade e baixa biodegradabilidade pelos microrganismos (IVSHINA *et al.*, 1998). Deste modo, a produção comercial de biosurfactante tem despertado crescente interesse devido às características de inespecificidade (diversidade química com multifuncionalidade), ser de fácil biodegradabilidade e apresentar baixa ou nenhuma toxicidade, bem como a possibilidade de ser produzido a partir de substratos renováveis (KUYUKINA *et al.* 2001).

No entanto, a produção em escala industrial de biosurfactantes ainda requer custo elevado para o processo, não existindo competição com relação à produção dos surfactantes sintéticos (DESAI & BANAT, 1997).

Uma alternativa para se usar o biosurfactante é adicioná-lo *in situ* ou estimular sua produção pela microbiota para a biorremediação em derramamentos de óleos, solos contaminados com metais e resíduos aquíferos (óleos e gorduras) das indústrias de alimentos (CARVALHO *et al.*, 1998).

2.3. Lignina

Em 1832, o cientista francês De Candolle, introduziu o termo Lignina (*lignum* = madeira), para substâncias incrustrantes não-celulósicas presentes na madeira. A deposição da lignina em plantas como forma de adaptação ao ambiente terrestre é um processo relativamente recente, datando 430 milhões de anos (BOUDET, 2000).

A lignina é uma macromolécula tridimensional, hidrofóbica e opticamente inativa, formada a partir de monômeros de fenilpropano, como os álcoois p-cumarílico (não-metoxilado), p-coniferílico (monometoxilado) e p-sinapílico (dimetoxilado), possuindo uma estrutura altamente complexa devido ao número de ligações entre os monômeros, possuindo alta massa molar (TUOR *et al.*, 1995); por isso, é difícil ocorrer a biodegradação deste composto no ambiente.

A Figura 4 ilustra a estrutura da lignina, na qual a ligação mais abundante (maior que 50% na estrutura) é do tipo β -O-4 entre as unidades aromáticas 1-2, 2-3, 4-5, 6-7, 7-8, 13-14; ligações β -1 entre as unidades 9-10; ligações entre anéis (5-6), ligações cruzadas entre a lignina e carboidratos da madeira (unidades 9-10), entre outras.

A lignina é o principal mecanismo de sustentação dos tecidos vegetais e proteção contra microrganismos. A digestão no rúmen dos animais é limitada pela ligação estável entre lignina e carboidratos complexos presentes nas células vegetais. Apenas os fungos de degradação branca e actinomicetos possuem a capacidade de degradação destas estruturas (KAJIKAWA *et al.*, 2000).

A população microbiana do rúmen decompõe a ligação β -O-4 da macromolécula da lignina sob condição anaeróbia (KAJIKAWA, 2000). Ainda nesta mesma condição, as quebras de ligações bifenílicas, ligações C-C, das posições α e β -alquilas e entre anéis cumarílicos foram demonstradas nos trabalhos de CHEN e colaboradores (1985 e 1987). A solubilização da lignina por um fungo anaeróbio do rúmen resultou em quebra de ligações éster e éter de unidades fenólicas, originando ácidos fenólicos. Porém, as ligações mais abundantes na estrutura não foram quebradas, bem como as ligações cruzadas entre lignina e polissacarídeos da madeira (McSWEENEY *et al.*, 1994).

Pela natureza irregular e recalcitrante da lignina e pelo fato de apresentar em sua estrutura moléculas primárias de fenóis, bifenilos, anisóis, diaril-éteres encontradas em outros poluentes aromáticos, a degradação de todos estes compostos pode ocorrer via sistema enzimático ligninolítico produzidos pelos fungos de degradação branca.

A degradação da lignina por fungos de degradação branca e actinomicetes ocorre no metabolismo secundário e quando há limitação de carbono, nitrogênio e enxofre no metabolismo primário (KIRK & FARRELL, 1987). A lignina não pode ser degradada como única fonte de carbono e energia, requerendo a presença de fontes e carbono adicionais como celulose, hemicelulose (DE JONG *et al.*, 1994) ou glicose (LEE, 1997).

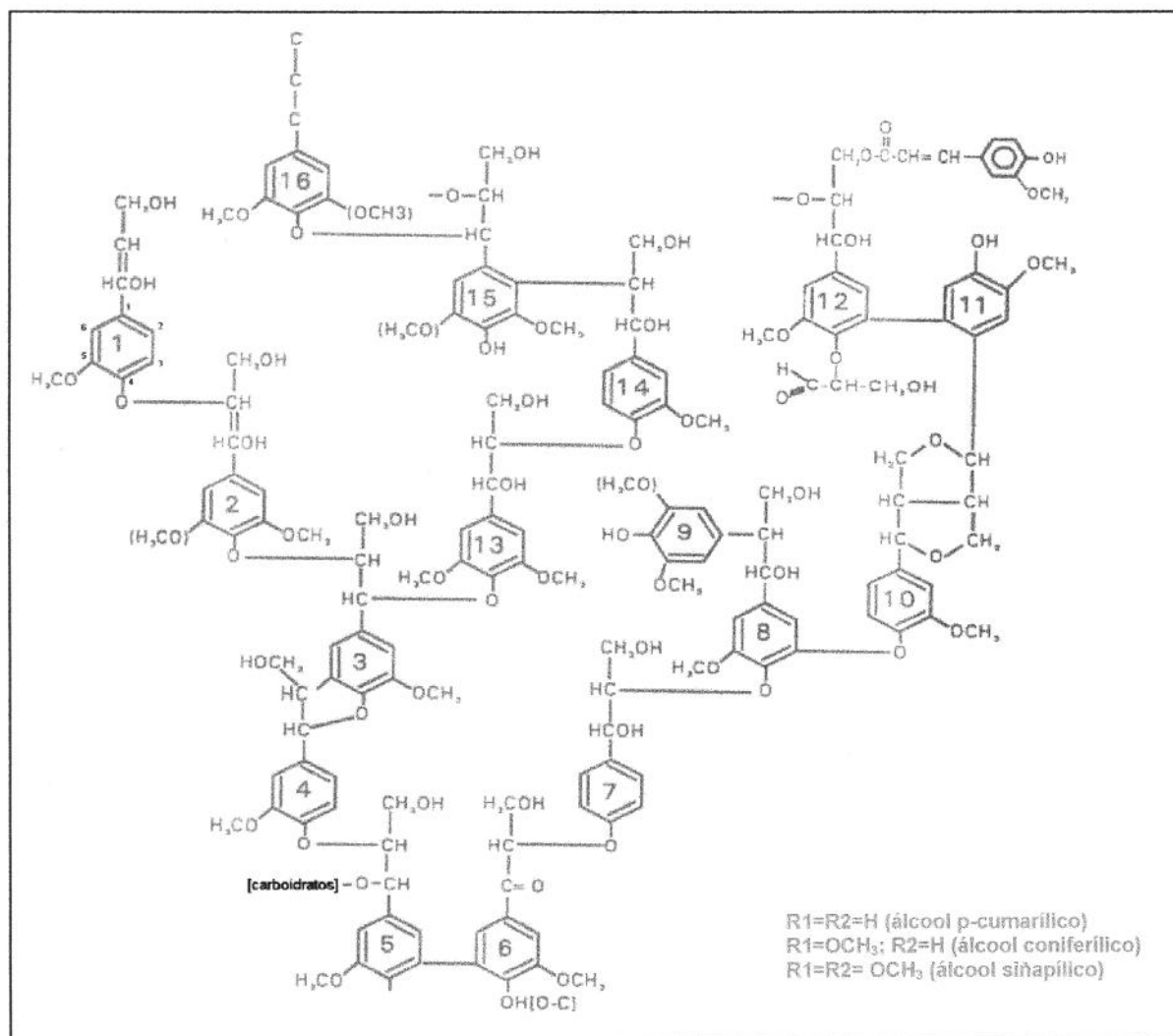


Figura 4 – Estrutura química provável da lignina (LEE, 1997).

A degradação da lignina é geralmente um processo oxidativo, havendo a necessidade de oxigênio para a estimulação da degradação pelos fungos basidiomicetos (LEE, 1997). A despolimerização das frações de lignina com altas massas molares vem acompanhada por conseqüente repolimerização das frações resultantes de menores pesos moleculares (LAMAR, 1992).

Os fungos de degradação branca decompõem naturalmente a lignina para obtenção da celulose presentes na parte interna das fibras da madeira, utilizando um sistema não-específico de enzimas extracelulares. Este sistema pode atuar sobre uma grande faixa de contaminantes recalcitrantes complexos e poliaromáticos introduzidos no solo (CANET *et al.*, 1999).

A degradação de lignina por fungos, com a utilização do sistema enzimático ligninolítico, é muito importante para a diminuição da poluição ambiental (BARR & AUST, 1994a e 1994b).

A inespecificidade das enzimas ligninolíticas produzidas proporciona a atuação destes microrganismos na degradação de inúmeros poluentes ambientais persistentes com estruturas complexas e poliaromáticas similares à macromolécula de lignina, como é o caso dos compostos de interesse neste trabalho (HAPs, ácidos lignosulfônico e tânico). Assim, podemos relacionar a habilidade de degradação destas moléculas com os mecanismos utilizados pelos fungos ligninolíticos (KATAYAMA & MATSUMURA, 1991; LAMAR *et al.*, 1993; COLOMBO *et al.*, 1996).

2. 4. Outros compostos orgânicos recalcitrantes similares à estrutura da lignina

2. 4. 1. Ácido Lignosulfônico

Os lignossulfonatos são produzidos pelas indústrias de papel, gerado durante o processo de branqueamento e polpação da celulose, sendo altamente coloridos devido ao grande conteúdo de lignina presente (FALCONI, 1998). Pode ser empregado como quelante sintético de microelementos, macroelementos e aminoácidos para o tratamento do solo, estimulando o crescimento da raiz e formando uma camada muscilaginosa que a protege de patógenos e da abrasão.

O ácido lignosulfônico (Figura 5) contém grande quantidade de carboidratos da madeira (glicose, xilose), nitrogênio e outros traços minerais que fazem deste composto uma alternativa de substrato para o desenvolvimento de fungos ligninolíticos (AITKEN & LOGAN, 1996).

Porém, este composto causa o desequilíbrio do ecossistema aquático por indisponibilizar a luz solar da superfície dos rios para a vida de algas e bactérias fotossintetizantes devido à coloração intensa das águas, uma vez que não pode ser utilizado pela maioria dos microrganismos presentes nestes ecossistemas.

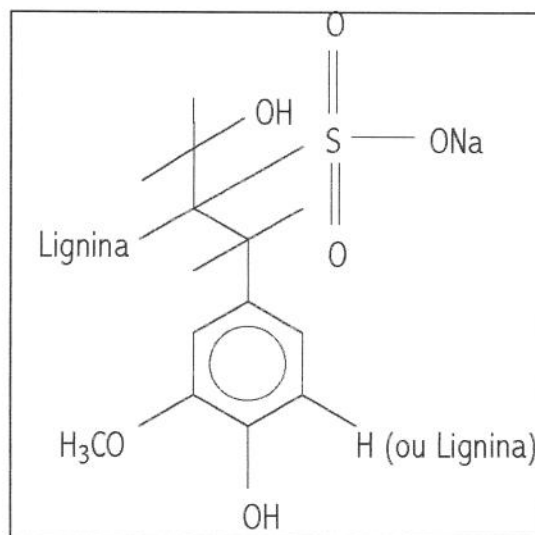


Figura 5 – Estrutura química do ácido lignosulfônico (ALDRICH®)

2. 4. 2. Ácido Tânico

Os taninos são compostos polifenólicos bastante abundante em tecidos vasculares de vegetais (HERNES *et al.*, 2001). São moléculas recalcitrantes e resistentes ao ataque microbiano (SAXENA *et al.*, 1995). A inibição da decomposição dos polifenóis na natureza ocorre devido à capacidade destes compostos em se complexarem estavelmente com as enzimas envolvidas no processo de degradação (BENDING & READ, 1996a).

Os taninos são classificados em dois grupos: as proantocianidinas (taninos condensados), encontrados em gimnospermas e angiospermas; e os poliéster de ácido gálico ou ácido hexahidroxidifênico (taninos hidrolisáveis), encontrados apenas em dicotiledôneas (HERNES *et al.*, 2001). Protegem as plantas contra herbivoria e invasão de patógenos pelas propriedades antimicrobiana e antifúngica.

O ácido tânico (AT) pertence ao grupo dos taninos hidrolisáveis (Figura 6a), composto de uma molécula de glicose unida por ligações ésteres a moléculas de ácido gálico ou similares (Figura 6b).

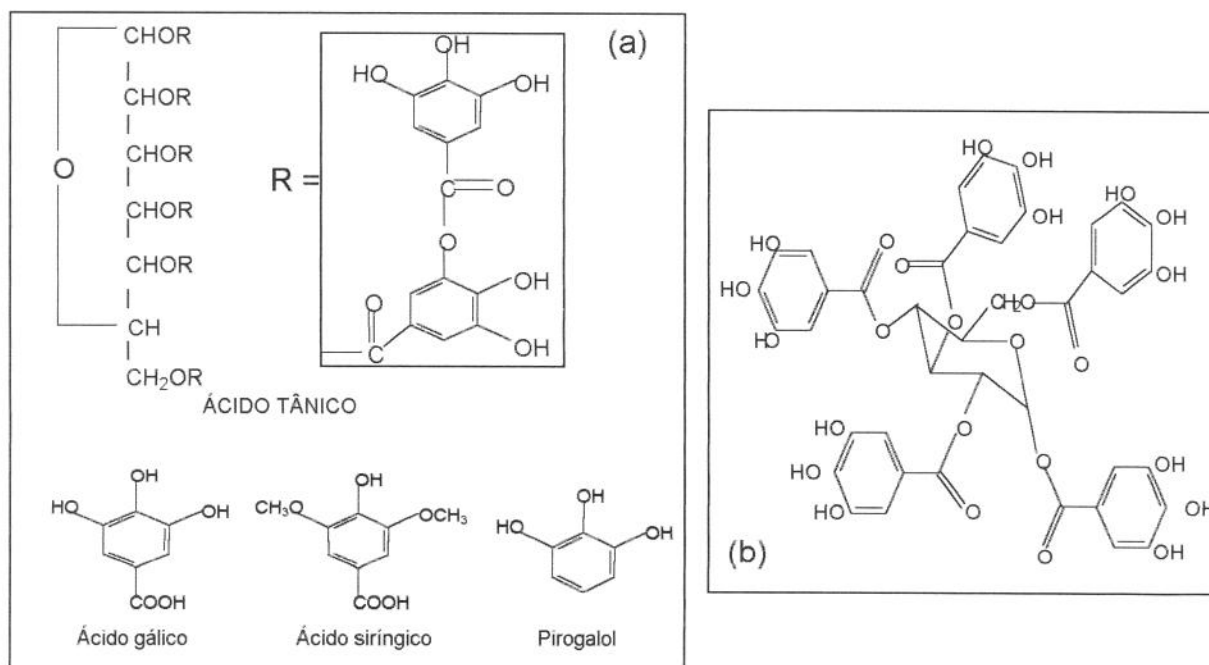


Figura 6 – (a) Estrutura química do ácido tânico (KHAN, 2000); (b) Tanino hidrolisável (HERNES *et al.*, 2001).

O ácido tânico pode ser empregado como aditivo em medicamentos de verminoses, envenenamentos e antidiarréicos (KHAN *et al.*, 2000); como aroma em bebidas e doces, clarificador em fermentações e na produção de vinhos (ODONERA *et al.*, 1994). Em presença de Cu^{+2} causa danos ao DNA pela geração de radical hidroxila (oxidante). Tal composto possui também uma possível ação antioxidante, protegendo o DNA contra clivagem, inibindo o radical hidroxila e o oxigênio singlete (KHAN *et al.*, 2000).

O ácido tânico possui propriedade anti-nutricional em herbívoros pela habilidade de se combinar com as proteínas, celulose, hemicelulose, pectina e minerais, retardando a digestão (McSWEENEY *et al.*, 2001), realizando ainda a formação de complexos com outras substâncias que contenham nitrogênio orgânico, incluindo aminoácidos, peptídeos, quitina e ácidos nucleicos (BENDING & READ, 1996b).

Fungos filamentosos, especialmente *Aspergillus niger* (BHAN *et al.*, 1997) e *Penicillium* ssp foram capazes de crescerem em ácido tânico como única fonte de carbono. Outros fungos dos gêneros *Chaetomium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Cylindrocarpon*, *Trichoderma* e *Candida* foram capazes de degradar os efluentes tânicos (SAXENA *et al.*, 1995).

Fungos ectomicorrízicos possuem pouca habilidade na degradação do ácido tânico devido à inativação das enzimas extracelulares produzidas. Porém, alguns fungos micorrízicos conseguem utilizar proteínas mesmo na presença do AT, ocorrendo quebra enzimática do complexo por ação de peroxidases e fenoloxidasas (BENDING & READ, 1996b). Já, o fungo ericóide *Hymenoscyphus ericae* degrada AT, ocorrendo produção de coloração marrom no meio, devido a polimerização dos produtos de degradação pelas fenoloxidasas extracelulares (BENDING & READ, 1996a e 1996b). A formação de um complexo deste polifenol com o nitrogênio orgânico, proporciona a regulação da mineralização deste elemento na natureza, havendo uma importância ecológica para a existência do ácido tânico no ecossistema.

Fungos não-basidiomicetos degradadores de madeira produziram enzimas ligninolíticas peroxidases e fenoloxidasas quando crescidas em AT e ácido gálico.

Um grande número de espécies estudado por LEE (2000) apresentou produção de enzimas igual ou maior que as produzidas por *Coriolus versicolor*, basidiomiceto de degradação branca.

Uma cultura bacteriana isolada do rúmen de cabra foi capaz de degradar grande quantidade de AT em condição anaeróbia (NELSON *et al.*, 1995). Outras bactérias do rúmen de herbívoros: *Eubacterium oxidoreducens*, *Streptococcus bovis*, *Syntrophococcus sucromutans* e *Coprococcus* sp descarboxilaram o ácido gálico da estrutura do tanino, transformando-o em pirogalol, convertendo este composto em resorcinol e floroglucinol, ocorrendo abertura do anel aromático a acetato e butirato (MURDIATI *et al.*, 1992), como demonstrado na Figura 7.

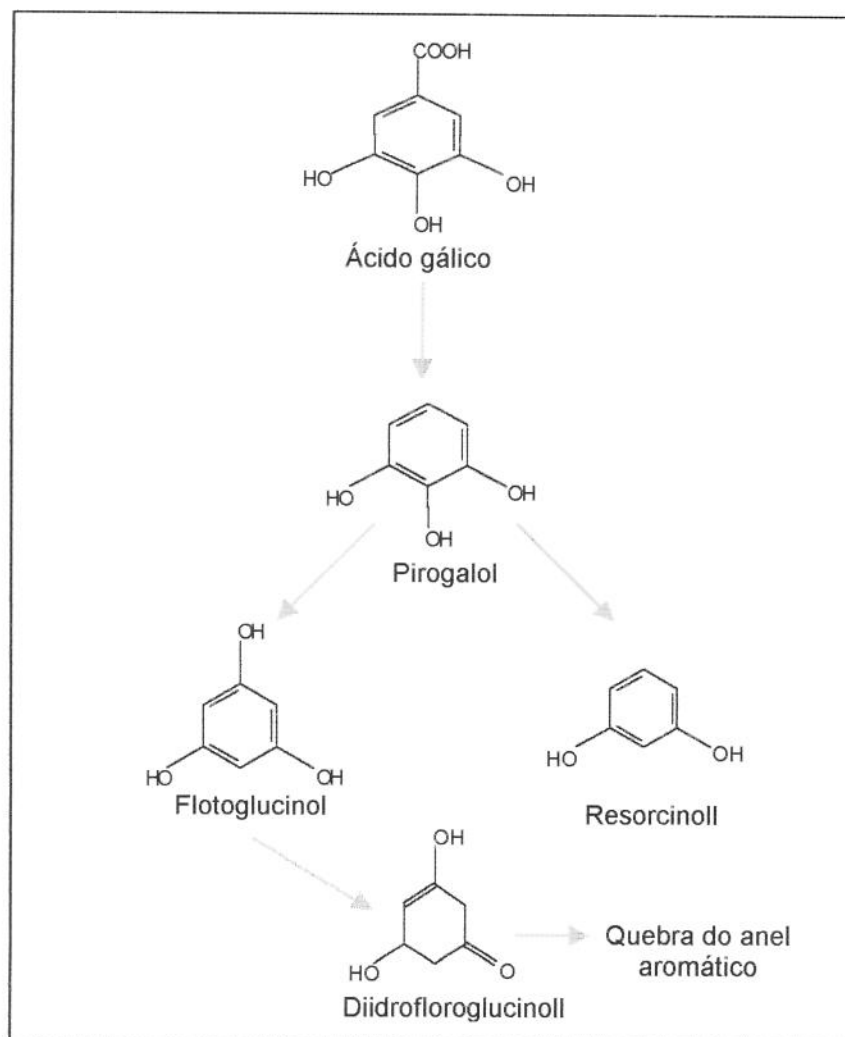


Figura 7 – Rota de degradação de um trihidroxibenzenóide (sub-estruturas do AT) sob condição anaeróbia no rúmen de herbívoros (McSWEENEY *et al.*, 2001).

2. 5. Enzimas ligninolíticas envolvidas na degradação dos compostos orgânicos recalcitrantes

As enzimas ligninolíticas são extracelulares e não-específicas a um único substrato, agindo via mediadores não protéicos. A regulação dessas enzimas é um fenômeno complexo e suas produções ocorrem durante o metabolismo secundário (fase estacionária), quando se esgota a fonte de carbono, nitrogênio ou enxofre (KIRK & FARRELL, 1987; DIX & WEBSTER, 1995).

O ataque dos fungos ao polímero de lignina ou aos compostos poliaromáticos e complexos similares à sua estrutura ocorre através da ação de peroxidases (lignina-peroxidase, manganês-peroxidase e outras peroxidases), fenoloxidasas (lacase, tirosinase) e enzimas produtoras de peróxido de hidrogênio.

Segundo TUOMELA *et al.* (2000), há três tipos de degradação da madeira por fungos: degradação branca, degradação marrom e a degradação branda. Fungos basidiomicetos e alguns ascomicetos são responsáveis pela *degradação branca*, onde há rápida decomposição e mineralização apenas da lignina (degradação seletiva) ou também da celulose e hemicelulose da madeira (degradação não-seletiva). A *degradação marrom* pode ser realizada também por alguns basidiomicetos pela decomposição parcial e mais lenta da lignina por demetoxilações, preferencialmente em madeira mole. Os outros componentes da madeira, celulose e hemicelulose, podem ser mineralizadas por esses fungos. Um outro tipo de degradação da madeira, a *degradação branda*, é realizada por grande parte dos ascomicetos e deuteromicetos, responsáveis pela lenta degradação da lignina, mais largamente frações de madeira “dura” em ambientes com excesso de umidade. Apesar da capacidade limitada de degradação quando em cultura pura, estes fungos são importantes degradadores em culturas mistas no solo.

Dentre os fungos de degradação branca, *Phanerochaete chrysosporium* tem sido extensamente estudado pela sua capacidade em degradar diversos poluentes químicos no solo e em culturas líquidas, com a produção do sistema enzimático ligninolítico. Porém, este fungo também possui a capacidade de biotransformar

compostos por outras rotas, como o sistema da monooxigenase citocromo P-450, utilizando ainda outras enzimas (intracelulares e ligadas à membrana) com atividades importantes para a biorremediação (CAMERON *et al.*, 2000).

De acordo com a produção das enzimas ligninolíticas, os fungos de degradação branca são divididos em 5 grupos (segundo TUOR *et al.*, 1995):

- Grupo I: fungos produtores de LiP e MnP, com ausência de Lacase (ex. *Phanerochaete chrysosporium*, *Coriolo versicolor* e *Phlebia radiata*);
- Grupo II: fungos produtores de MnP e Lacase, com nível não detectado de LiP (ex. *Dichomitus squalens* e *Lentinus edodes*);
- Grupo III: fungos produtores de LiP e um tipo de fenoloxidase (sendo lacase a enzima predominantemente produzida). Geralmente colonizam madeira “dura”;
- Grupo IV: fungos produtores apenas de LiP ;
- Grupo V: fungos com o sistema enzimático com caracterização incompleta, sem a detecção de enzimas oxidativas (ex. *Fomes lignosus* e *Trametes cingulata*).

Os fungos filamentosos nem sempre produzem as enzimas ligninolíticas para a degradação dos composto poluentes no propósito de obterem energia para a célula. A conversão dos poluentes por fungos é um processo de detoxificação, podendo haver sinergismo no ambiente com as bactérias que assimilam rapidamente os produtos da biotransformação realizada pelos fungos (BOONCHAN, 2000).

2.5.1. Lignina – peroxidase (Diarylpropane: oxygen, hydrogen-peroxide oxidoreductase; EC 1.11.1.14)

Em 1983, experimentos de GOLD e KIRK & TIEN revelaram em cultura de *Phanerochaete chrysosporium* uma enzima extracelular dependente de peróxido de hidrogênio responsável pela despolimerização parcial da lignina *in vitro*. Posteriormente, detectou-se produção de LiP por outros fungos basidiomicetos de degradação branca como *Phlebia radiata*, *Panus tigrinus*, *Coriolo versicolor*, *Pleurotus ostreatus* e *Bjerkandera adusta* (KIRK & FARRELL, 1987).

A Lignina-peroxidase (LiP) é uma glicoproteína que contém 1 mol de ferro protoporfirínico IX por 1 mol de enzima (GOLD *et al.* 1989). O ponto isoelétrico das isoenzimas de LiP variam de 3,3 a 4,7 e massa molar de 38 a 43 kDa (REDDY & D'SOUZA, 1994). As isoenzimas de LiP (H1, H2, H6, H7, H8 e H10) foram identificadas de acordo com a eluição em coluna de troca iônica e são codificadas por diferentes genes em *P. chrysosporium*, *P. radiata*, *B. adusta* e *T. versicolor* (DE JONG *et al.*, 1994).

A LiP é uma enzima dependente de H_2O_2 que catalisa a oxidação da lignina em meio fortemente ácido, bem como os compostos fenólicos e não fenólicos com alto potencial de óxido-redução através da remoção de um elétron do núcleo aromático, produzindo radicais catiônicos arila, os quais darão origem a uma série de produtos finais por reações não-enzimáticas (GOLD & ALIC, 1993; HATTAKA, 1994; BOGAN & LAMAR, 1995).

Esta enzima é responsável pela clivagem de algumas ligações presentes na estrutura da lignina como $C\alpha-C\beta$, $\beta-O-4$, $\beta-1$, de anéis aromáticos, quebra de cadeias laterais, entre outras (KIRK & FARRELL, 1987). Compostos policíclicos aromáticos e dibenzodioxinas são oxidados a quinonas e outros produtos (HAMMEL *et al.*, 1986; SANGULARD *et al.*, 1986).

O ciclo catalítico da LiP (Figura 8) se inicia com a oxidação do grupo prostético da enzima Fe(III) a Fe (IV), pela ação de H_2O_2 , originando o composto I. Reduções sucessivas do composto I a composto II e deste ao estado nativo da enzima, via transferência de um elétron, completa o ciclo catalítico da LiP. Na ausência de substrato redutor (álcool veratrílico ou H_2O_2), o composto II pode ser

oxidado, possuindo limitada capacidade catalítica (DE JONG *et al.*, 1994; BARR & AUST, 1994).

O álcool veratrílico (AV) é um metabólito secundário produzido pelos fungos e possui um papel importante na estabilização da atividade de LiP, preservando-a contra inativação por H_2O_2 (WARIISHI *et al.*, 1990), sendo cofator enzimático e mediador oxidativo, responsável pela transferência de elétrons no sistema (LAMAR, 1992). O álcool veratrílico é um excelente substrato para LiP e pode oxidar outros compostos que não são diretamente oxidados pela enzima (ZAPANTA & TIEN, 1997).

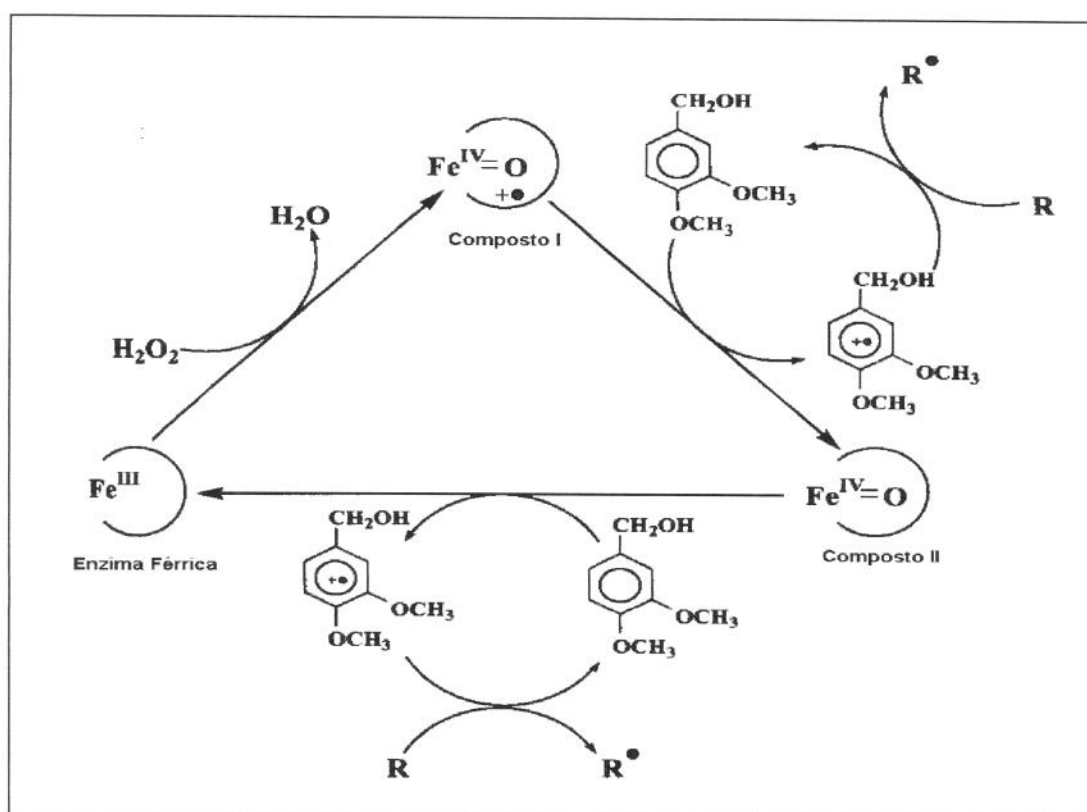


Figura 8 – Ciclo catalítico da Lignina-peroxidase (CAMERON *et al.* 2000).

A Lignina-peroxidase está presente em culturas de basidiomicetos e também de ascomicetos (RODRIGUÉZ *et al.*, 1997), atuando em uma grande variedade de compostos recalcitrantes aromáticos, fenólicos e policíclicos (KARAN & NICCEL, 1997). A remoção da coloração de efluente do processo Kraft por imobilização de LiP foi verificado por FERRER *et al.*, 1991; DEZOTTI *et al.*, 1995; PERALTA-ZAMORA *et al.*, 1998).

2.5.2. Manganês – peroxidase (MnP – Mn(II): hydrogen-peroxide oxidoreductase; EC 1.11.1.13)

Esta enzima foi isolada pela primeira vez no meio extracelular de cultivo de *Phanerochaete chrysosporium* (KUWAHARA *et al.*, 1984). É uma peroxidase glicoproteica que possui como grupo prostético ferro protoporfirínico IX (BUSWELL & ODIER, 1987), sendo ativa em pH próximo de 5. As isoenzimas de MnP (H3, H4, H5 e H9) possuem massas molares de 45-47 kDa e pontos isoelétricos variando entre 4,2 a 4,9 (GOLD & ALIC, 1993 e CAI & TIEN, 1993).

A atividade de MnP é dependente de H_2O_2 e íons Mn(II), os quais são oxidados a Mn(III), que por sua vez oxida substratos orgânicos como fenóis, aminas e corantes aromáticos (BANCI *et al.*, 1999), catalisando ainda quebras de ligações do C α -C β , oxidações do C α e quebra de ligações aril-alquílicas de fenóis siringílicos diméricos β -1 e β -O-4 na estrutura da lignina (TUOR *et al.*, 1992).

Participa ainda de reações de descarboxilação e demetilação de ligninas (GUTIÉRREZ *et al.*, 1999), cloroligninas e substratos aromáticos (CAMARERO *et al.*, 2000); bem como do branqueamento da polpa Kraft por deslignificação (KANEKO *et al.*, 1995 e MOREIRA *et al.*, 1997).

O ciclo catalítico da enzima se assemelha ao ciclo da LiP, como demonstrado na Figura 9. A formação do composto I ocorre pela oxidação do Fe(III) a Fe(IV) na presença de H_2O_2 . A redução deste compostos é feita via transferência de um elétron. O íon Mn(II) atua como doador de elétron para esta etapa, originando íon Mn(III) que se complexa com ácidos orgânicos como malonato e oxalato secretados por *P. chrysosporium* (WARIISHI *et al.*, 1992 e ZAPANTA & TIEN, 1997); citrato, lactato (GOODWIN *et al.*, 1995) ou ainda tartarato (MARTÍNEZ *et al.*, 1996), ficando Mn(III) estabilizado por quelação. Tal complexo de acetoácidos com íons Mn(III) difunde-se para catalisar oxidações de compostos fenólicos e corantes, gerando radicais fenoxila (WARIISHI *et al.*, 1992 e DE JONG *et al.*, 1994).

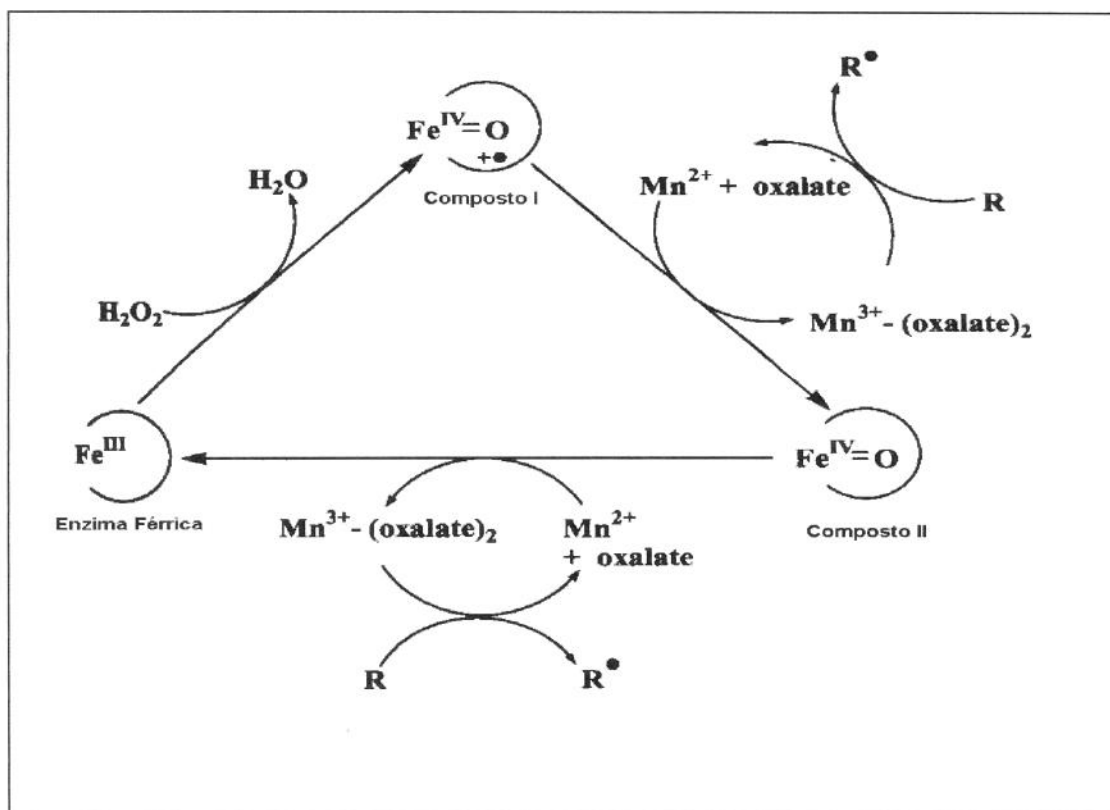


Figura 9 – Ciclo catalítico da Manganês – peroxidase (CAMERON *et al.*, 2000).

Pelo fato de MnP ser uma enzima extracelular, o suprimento de H_2O_2 pode também ser obtido pela oxidação do NADH. Porém, o excesso deste ativador enzimático, transforma o composto II em III, com menor capacidade catalítica. O íon $\text{Cu}(\text{II})$ pode inibir a atividade de MnP por catalisar a reação de $\text{Mn}(\text{III})$ com H_2O_2 (AITKEN & IRVINE, 1990).

A manganês-peroxidase tem sido detectada também em culturas de outros fungos basidiomicetos de degradação branca como os gêneros *Bjerkandera*, *Trametes*, *Pleurotus*, *Phlebia* e *Ceriporiopsis* (HATTAKKA, 1994). As isoenzimas de MnP, quando mutadas pela troca de aminoácidos, podem apresentar maior resistência à inativação por H_2O_2 e estabilidade para temperatura e pH (READING & AUST, 2000) ou ainda apresentar oxidação por uma maior variedade de substratos, como a LiP (TIMOFEEVSKY *et al.*, 2000).

Diferentes isoenzimas de MnP foram purificadas e as seqüências N-terminais de diferentes fungos foram comparadas (PALMA *et al.*, 2000). Uma importante diferença para MnP produzida por *Bjerkandera sp* é a atividade enzimática independente de Mn(II) em compostos aromáticos fenólicos e não-fenólicos. Tal atividade também foi anunciada anteriormente para espécies de *Pleurotus* por MARTÍNEZ e colaboradores (1996). Portanto, sugere-se dois tipos de MnP: as estritamente dependentes de Mn(II) e as que possuem afinidade mais baixa ao íon.

2. 5. 3. Peroxidases (EC 1.11.1.7)

Peroxidases fúngicas extracelulares envolvidas na degradação de material ligninolítico ainda não foram bem caracterizadas; porém, não reagem com álcool veratrílico como a LiP (DE JONG *et al.* 1994).

Suas atividades assemelham-se a da HRP (horseradish peroxidase), responsável pela oxidação de fenóis e hidroxilação de compostos aromáticos. Porém, estão presentes na degradação inicial de poluentes não-fenólicos por fungos de degradação branca (MAJCHERCZYK *et al.*, 1998). Possuem potencial degradação de corantes, compostos clorados e dioxinas (ANTONOPOULOS *et al.* 2001).

São responsáveis também pela polimerização dos precursores da lignina, do ácido húmico e de produtos tóxicos reativos da atividade de outras enzimas, protegendo o micélio fúngico (BOUDET, 2000).

Recentemente, uma nova peroxidase ligninolítica foi descrita para os gêneros *Pleurotus* e *Bjerkandera*, a qual possui as propriedades catalíticas de LiP e MnP combinadas: capazes de oxidar o álcool veratrílico fenóis, hidroquinonas e alguns corantes na ausência de Mn(II), (CAMARERO *et al.*, 2000).

2.5.4. Polifenoloxidasas

A atividade de fenoloxidasas extracelulares foi descoberta na década de 30, em fungos de degradação branca. São enzimas oxidoredutoras que não requerem H_2O_2 como ativador da reação, divididas em dois grupos: lacases e tirosinases (DURÁN & ESPOSITO, 2000). São capazes de transformar compostos aromáticos, metabólicos da degradação de lignina e taninos (TAGGER *et al.*, 1998).

As fenoloxidasas possuem também a capacidade de polimerizar os monômeros resultantes da degradação da lignina, propriedade esta utilizada para a polimerização de polifenóis na síntese de compostos orgânicos; porém, as principais aplicações destas enzimas são na detoxificação ambiental e no biobranqueamento de efluentes nas indústrias de polpa e papel.

2.5.4.1. Lacase (benzenodiol: O_2 oxidoredutase - EC 1.10.3.2)

A lacase é uma fenoloxidase produzida por fungos e plantas (THURSTON, 1994), pertencendo ao grupo de oxidasas que complexam o cobre. Esta enzima foi descrita em apenas uma linhagem bacteriana isolada da rizosfera: *Azospirillum lipoferum* (BALLY *et al.*, 1983). Possui massa molecular de 60-100 kDa e íons $Cu(II)$ no seu sítio ativo (SZKLARZ *et al.*, 1989). É uma enzima constitutiva, sendo produzida pelos fungos de degradação branca no metabolismo primário (EGGERT *et al.*, 1996).

A lacase catalisa a redução de oxigênio bimolecular para água (Figura 10) com simultânea oxidação via transferência de um elétron do grupo fenólico dos compostos para radicais fenoxilas (MAJCHERCZYK *et al.*, 1998). A atividade de lacase está relacionada com a degradação da lignina e com as subseqüentes transformações dos HAPs após ataque inicial dos anéis aromáticos (COLLINS *et al.*, 1996).

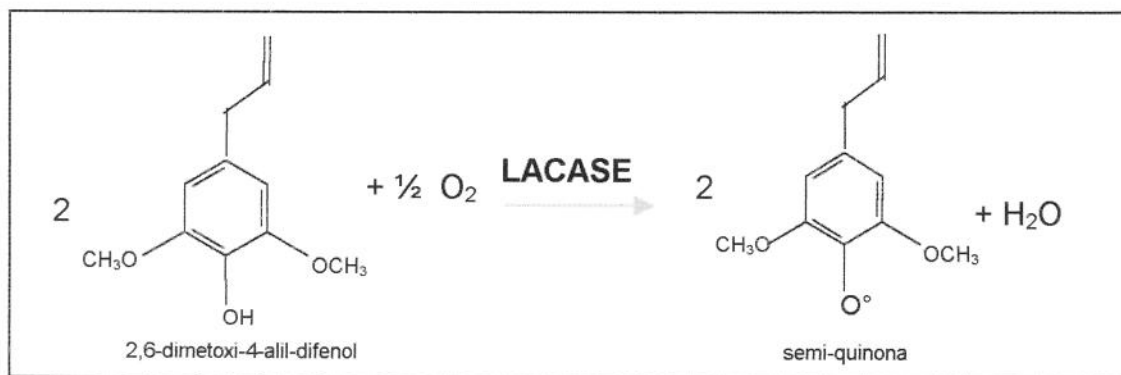


Figura 10 – Mecanismo de oxidação proposto para Lacase (SUGUMARAN & BOLTON, 1998).

A habilidade da lacase em quebrar ligações C α -C β e de cadeia lateral dos compostos modelos de lignina foi verificada anteriormente por KAWAI e colaboradores em 1988. A aplicação desta enzima em sistema de polpa Kraft de madeira dura resultou na demetilação e despolimerização da polpa (CALL & MÜCKE, 1995). A oxidação de grupos metoxilados e benzil-alcóois a benzaldeídos também foi verificada por POTTHAST e colaboradores (1995 e 1996).

Monômeros precursores da lignina e diversos fenóis são transformados pela lacase de fungos de degradação branca (TAGGER *et al.*, 1998). Em tratamentos de efluentes de indústrias de polpa e papel, as lacases oxidam estruturas fenólicas a quinonas, formando complexos insolúveis, facilmente removidos por precipitação ou filtração (ALBERTI & KLIBANOV, 1981). Lacase de *Trametes versicolor* (fungo de degradação branca) foi capaz de degradar *in vitro* mais de 14 HAPs (MAJCHERCZYK *et al.*, 1998).

Esta enzima foi verificada em meio de cultivo de outros fungos ligninolíticos dos gêneros *Trametes*, *Pleurotus* e *Plebia*, *Penicillium chrysogenum*; exceto por *Phanerochaete chrysosporium* (RODRÍGUES *et al.*, 1996).

2.5.4.2. Tirosinase (tirosina 3, 4-hidroxisfenilalanina: oxidoreductase - EC 1.14.18.1 e o-difenoloxidase: oxidoreductase - EC 1.10.3.1)

Esta enzima possui atividades de monofenol monooxigenase (transformando monofenol a o-difenol) e o-difenoloxidase (oxidando o-difenol). Atua em substratos fenólicos e catecólicos a quinonas (KROL & BOLTON, 1997 e SUGUMARAN & BOLTON, 1998), como demonstrado na Figura 11.

Possuem participação na redução da toxicidade destes compostos fenólicos por reações de polimerização (THURSTON, 1994).

A imobilização da tirosinase para remediação de compostos aromáticos em presença de coagulantes catiônicos possui a vantagem de retê-la no reator e protegê-la contra inativação através de reações com quinonas (WADA *et al.*, 1992).

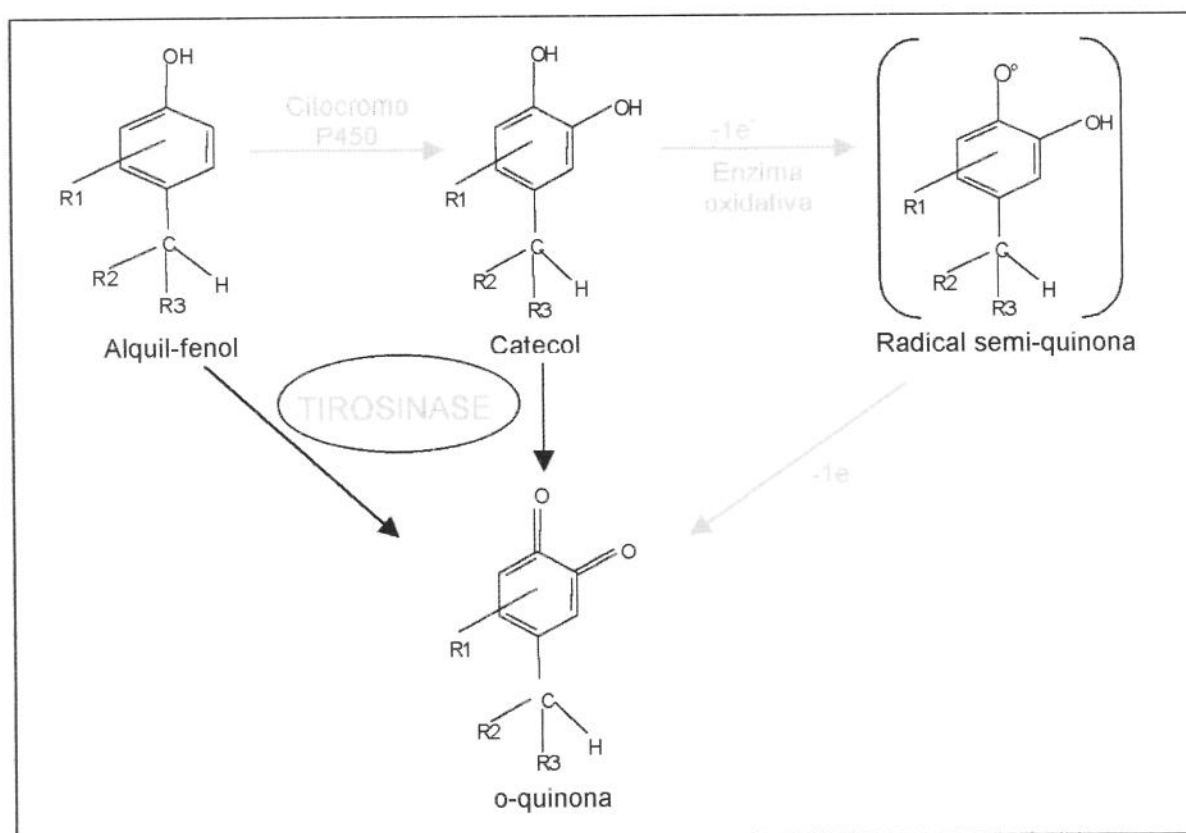


Figura 11 - Mecanismo de atuação da Tirosinase (KROL & BOLTON, 1997).

2.5.5. Enzimas produtoras de H_2O_2

Para o funcionamento do sistema enzimático ligninolítico das peroxidases, o H_2O_2 deve ser suprido por outras enzimas extracelulares e intracelulares produzidas durante o metabolismo secundário, simultaneamente com as enzimas ligninolíticas.

As aril-alcóis-oxidases (AAOs) são enzimas extracelulares que oxidam álcoois aromáticos a aldeídos e estes a ácidos, com simultânea redução do O_2 a H_2O_2 em culturas de fungos de degradação branca: *T. versicolor*, *P. sajor-caju*, *P. ostreatus*, *P. eryngii* e *B. adusta* (DE JONG *et al.*, 1994 e EVANS *et al.*, 1994). Tais produtos oxidados nestes processos são reciclados pelas desidrogenases intracelulares aril-aldeído e aril-álcool, como demonstrado na Figura 12.

Outras enzimas extracelulares produtoras de H_2O_2 , glioxal-oxidase e metil-glioxal, foram encontradas em cultura de fungos ligninolíticos por KERSTEN (1985).

As enzimas intracelulares produtoras de H_2O_2 encontradas em fungos de degradação branca são glicose-1-oxidase e glicose-2-oxidase (KELLEY & REDDY, 1986), piranose-2-oxidase, metanol-oxidase (NISHIDA & ERIKSSON, 1987) e acil-CoA-oxidase. Compostos como glicose, xilose, glioxal, metil-glioxal são oxidados para a geração de H_2O_2 (BARR & AUST, 1994).

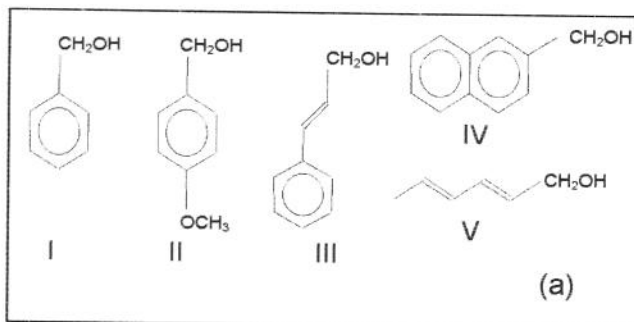
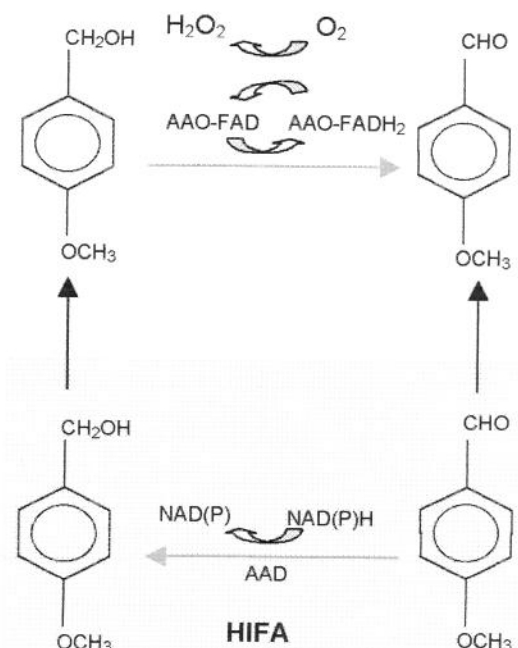


Figura 12 – (a) Substratos utilizados pela enzima aril-álcool-oxidase de *Pleurotus eryngii* (I:benzil-álcool; II: p-anisil-álcool; III: cinamil-álcool; IV: 2-naftalenometanol-álcool; V: 2,3-hexadien-1-ol) na produção de peróxido de hidrogênio (b) com reciclagem dos compostos pelas aril-álcool-desidrogenases intracelulares (VARELA *et al.*, 2000).



2.6. Biorremediação

Nas décadas passadas, a poluição dos solos era tratada utilizando processos químicos e físicos dispendiosos como lavagem do solo, extração com solventes e a incineração.

O uso de microrganismos ou processos biológicos para eliminar ou reduzir a concentração dos compostos xenobióticos e perigosos no ambiente denomina-se *biorremediação*, tecnologia alternativa viável e atual, cada vez mais utilizada para a detoxificação ambiental (SEMPLE, 2001).

Freqüentemente, a biorremediação deve atuar em ambientes multifásicos e heterogêneos como os solos, onde os contaminantes estão presentes em associação com partículas, dissolvidos nas fases líquida e gasosa deste sistema. Devido a esta complexidade, o sucesso da remediação dependerá de um enfoque multidisciplinar, envolvendo microbiologia, química, engenharias, geologia, ecologia, entre outros campos de pesquisa (BOOPATHY, 2000).

As técnicas de biorremediação podem ser realizadas tanto *in situ* como *ex-situ*. Nos processos *in situ*, o tratamento de material contaminado é realizado no próprio local, utilizando algumas técnicas como (segundo SEABRA, 2001):

- *Bioaumento*, adicionando-se microrganismos exógenos no meio contaminado;
- *Bioestimulação*, com a finalidade de estimular a população microbiana natural com alguns nutrientes necessários ao melhor crescimento;
- *Bioventilação*, que consiste na aeração forçada do local para a estimulação microbiana;
- *“Land treatment”* (tratamento do solo), onde ocorre aragem superficial para revolvimento dos contaminantes e adição eventual de nutrientes para estimular microrganismos indígenas;
- *Fitorremediação*, utilizando plantas para remover, transferir, estabilizar e destruir contaminantes orgânicos e inorgânicos, entre outras.

A utilização de processo *ex-situ* (com extração do material contaminado do local) é também bastante empregada na descontaminação ambiental através de algumas das técnicas (segundo BOOPATHY, 2000):

- “*Landfarming*”, sendo um processo biológico com utilização de células impermeáveis onde o meio contaminado é depositado e homogeneizado por aragem;
- *Biopilhas*, realizando escavações do solo e deposição em pilhas cobertas e com controles de temperatura, umidade, pH, nutrientes e oxigênio, para a estimulação da degradação pelos microrganismos presentes no próprio solo a ser biorremediado;
- *Bioreatores*, ocorrendo, então, processo de degradação *in vitro* realizado em reatores ou em recipientes de grande volume;
- *Compostagem*, que consiste em tratamentos termofílicos aeróbios, utilizando pilhas aeradas ou estáticas; entre outros processos.

A boa aceitabilidade destes processos naturais relativamente baratos para remediar o ambiente, quando comparado aos processos químicos, bem como a facilidade de poder estar trabalhando no próprio local contaminado são vantagens da biorremediação. Porém, vários compostos clorados, aromáticos de altos pesos moleculares e metais pesados podem ser resistentes à degradação. E ainda, a incerteza sobre a formação de produtos inertes ou mais tóxicos que os próprios compostos xenobióticos a serem tratados são desvantagens da biorremediação, necessitando de maiores pesquisas.

A utilização de fungos ligninolíticos ou do próprio sistema enzimático produzido para a degradação dos contaminantes é considerada uma técnica de biorremediação *in situ* ou *ex-situ* (SEABRA, 2001). Os fungos capazes de remediar locais inóspitos sob baixa oxigenação pode vir a ser uma alternativa promissora para diminuir os custos do processo.

A grande variedade de contaminantes orgânicos e inorgânicos que necessitam serem transformados em compostos menos tóxicos e inertes, na ausência de oxigênio, sugere processos micro e anaeróbios *in situ* com potencial aplicação para biorremediações futuras (SEABRA, 2001).

2.7. Biodegradação em ambientes microaeróbio e anaeróbio

A degradação de compostos aromáticos tóxicos pode ocorrer tanto aerobicamente quanto anaerobicamente (NIELSON, 1990 e HAGGBLOOM, 1992), uma vez que há ocorrência de contaminações por estes compostos em várias camadas profundas do solo, onde a concentração de O_2 é limitada. É de se esperar que a procura de microrganismos capazes de degradarem xenobióticos com a presença restrita e ou sem a presença de O_2 seja de grande importância.

A transformação de poluentes recalcitrantes complexos sob condição anaeróbia por bactérias anaeróbias facultativas e redutoras de nitrato, ferro, manganês e sulfato é realizada em menor intensidade quando comparada com a degradação aeróbia dos mesmos compostos (GRISHCHENKOV *et al.*, 2000).

Os microrganismos microaeróbios e anaeróbios encontrados em locais de baixa concentração ou ausência de O_2 podem biotransformar uma grande variedade de contaminantes orgânicos e inorgânicos (COATES & ANDERSON, 2000). Processos anaeróbios *in situ* podem ser tratamentos alternativos e ainda complementares para remediação de contaminantes recalcitrantes nas regiões de difícil acesso às técnicas aeróbias (FIELD *et al.*, 1995).

O metabolismo de degradação anaeróbia de compostos aromáticos é restrito àqueles de menores pesos moleculares. Em condição anaeróbia, os HAPs tendem a serem mais estáveis ao ataque inicial dos núcleos aromáticos, devido a ausência de oxigênio (HEIDER & FUCHS, 1997; ROCKNE & STRAND, 1998).

Sob condição microaeróbia, há a liberação de produtos parcialmente oxidados (CHU *et al.*, 1996). Os microrganismos que são capazes de degradarem HAPs, anaerobicamente, são divididos em anaeróbios facultativos (redutores de nitrato, ferro e manganês) e os anaeróbios restritos (redutores de sulfato), possuindo vantagens quanto a utilização dos aceptores finais de elétrons (McRAE & HALL, 1998; HEIDER & FUCHS, 1997). Os aceptores alternativos de elétrons, nesta condição, estimulam a remediação *in situ* de contaminantes do petróleo em sedimentos aquífero e em camadas profundas do solo (COATES & ANDERSON, 2000).

A degradação anaeróbia de HAPs pode aumentar com a presença de sulfato-redutor como aceitor final de elétrons como reportado por JOHNSON & GHOSH (1998); enquanto que a adição de nitrato-redutor para a mesma função não afeta a biodegradabilidade dos HAPs. A degradação de HAPs em sedimentos marinhos contaminados por petróleo pode ser realizada através de redução por sulfato (COATES *et al.* 1997). ROCKNE & STRAND (2000), por sua vez, verificaram a mineralização de hidrocarbonetos aromáticos bicíclicos e policíclicos, utilizados como únicas fontes de carbono e energia, por culturas redutoras de nitrato, produzindo N_2O .

Consórcios bacterianos anaeróbios (CHANG *et al.*, 1996), têm mostrado sucesso na degradação de clorofenóis, clorobenzenos e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos; porém, pouco se sabe ainda a respeito de oxidação de HAPs com mais de 4 anéis aromáticos (GALLI, 1994).

Pela ação bacteriana, os poluentes aromáticos são convertidos em compostos intermediários centrais polifenólicos (floroglucinol, resorcinol, hidroquinol – Figura 13) e benzoil-CoA (Figuras 14a e 14b), intermediário comum na maioria dos catabolismos anaeróbios de compostos aromáticos (HEIDER *et al.*, 1999).

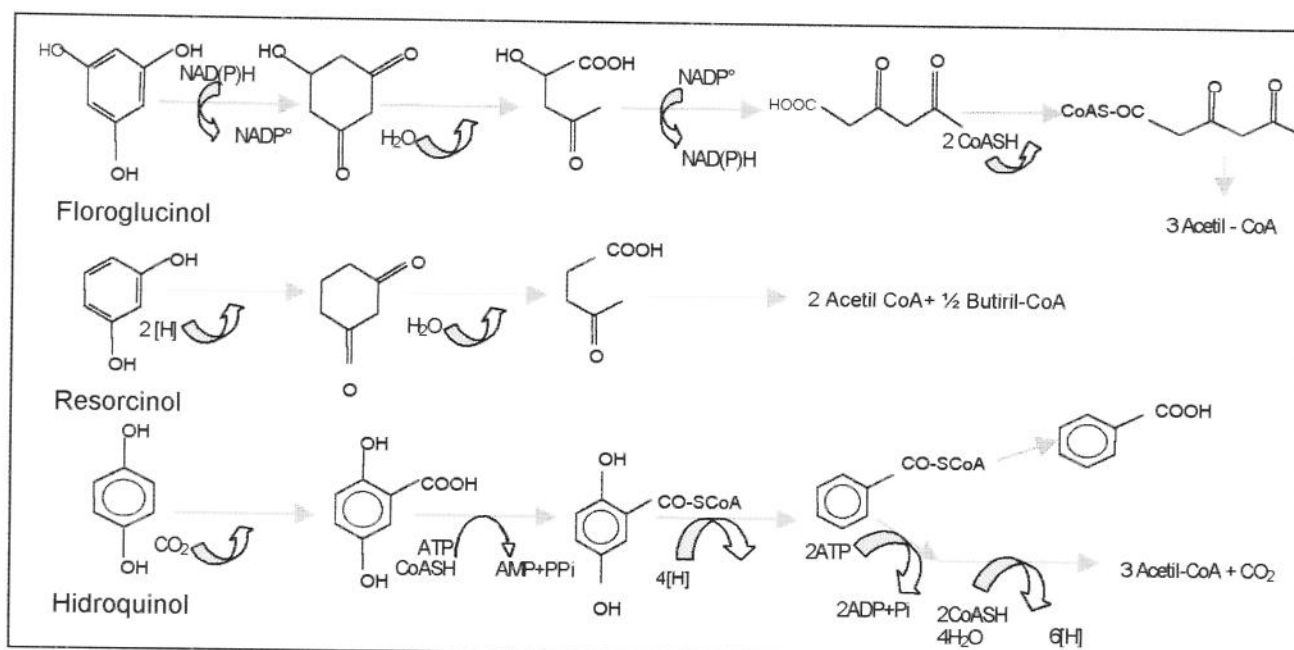


Figura 13 – Degradação anaeróbia de alguns compostos polifenólicos provenientes de compostos poliaromáticos (HEIDER & FUCHS, 1997).

As sucessivas reduções destes compostos a compostos não-aromáticos, originam acetil-CoA e CO_2 (HENDER & FUNCHS, 1997). Uma vez originando acetil-CoA, participam da rota respiratória e do anabolismo de várias outras substâncias necessárias para a célula.

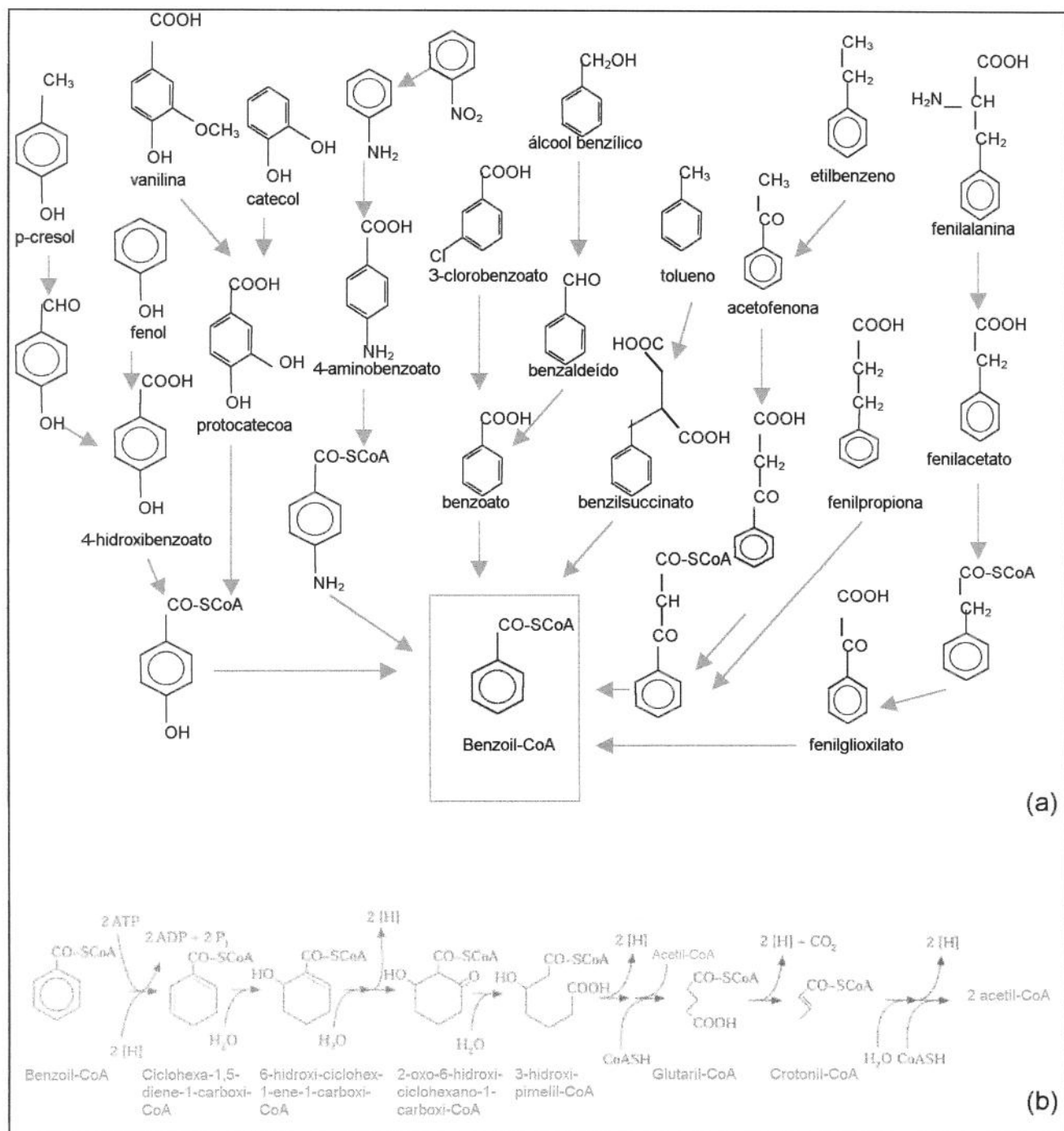


Figura 14 – (a) Biotransformação anaeróbica de compostos aromáticos via benzoil-CoA; (b) Rota de degradação do benzoil-CoA (HEIDER & FUCHS, 1997).

HEIDER e colaboradores (1998), relataram o uso de consórcio bacteriano anaeróbio (bactérias redutoras de nitrato e sulfato) capaz de degradar diferentes hidrocarbonetos monoaromáticos. No entanto, há poucos trabalhos descritos na literatura envolvendo degradação de HAPs por uma cultura anaeróbia pura.

As concentrações de oxigênio dentro dos troncos de árvores são extremamente baixas e a decomposição dos troncos caídos em florestas chuvosas é efetiva em ambiente de baixa oxigenação. Uma vez que a maioria dos fungos não apresenta sistema ligninolítico capaz de tolerar baixas concentrações de oxigênio, algum mecanismo desconhecido é responsável pela liberação do oxigênio necessário para as reações oxidativas envolvidas na degradação da lignina e de compostos poluentes em ambiente com baixa concentração de oxigênio. Portanto, fungos podem desenvolver adaptações durante o processo de crescimento, responsáveis pela tolerância a alguma condição extrema (BLANCHETTE, 1991).

DURRANT e colaboradores (1994, 1995 e 1996), estudaram fungos microaeróbios isolados de habitats com baixa concentração de O₂, tais como solos alagados ou com excesso de umidade, pântanos, sedimentos de rios, águas estagnadas e algumas linhagens foram capazes de fermentar a celulose sob condições anaeróbias. A capacidade de degradação da celulose, hemicelulose e compostos derivados da lignina por fungos em condições aeróbia e microaeróbia, com produção de celulasas, xilanases e enzimas lignocelulolíticas foi verificada por PAVARINA (1997).

Tais pesquisas foram de grande relevância em relação a biodegradação em ambientes anóxicos e de baixa oxigenação, uma vez que esses fungos crescem em condições variadas de oxigênio, participando mais ativamente na degradação de contaminantes.

3. OBJETIVOS

Estudar a degradação de compostos orgânicos recalcitrantes como os HAPs e macromoléculas aromáticas como ácido lignosulfônico e ácido tânico por fungos sob condições microaeróbia e anaeróbia.

3. 1. Em condição microaeróbia:

- Cultivar linhagens fúngicas em HAPs de baixo, médio e altas massas molares, ácido lignosulfônico e ácido tânico;
- Determinar as atividades de enzimas ligninolíticas (LiP, MnP, peroxidase e lacase) das linhagens crescidas em ácido lignosulfônico e ácido tânico;
- Determinar as atividades de enzimas ligninolíticas (LiP, MnP, peroxidase, lacase, tirosinase) e produção de biosurfactantes das linhagens crescidas em HAPs;
- Selecionar linhagens fúngicas quanto aos melhores crescimentos apresentados para a maioria das fontes de carbono utilizadas;
- Verificar a degradação destes compostos pelas linhagens selecionadas por cromatografia líquida de alta eficiência.

3. 2. Em condição anaeróbia

- Cultivar as linhagens fúngicas selecionadas, utilizando-se as mesmas fontes de carbono anteriores;
- Determinar as atividades de enzimas ligninolíticas (LiP, MnP, peroxidase e lacase) das linhagens crescidas em ácido lignosulfônico e ácido tânico;
- Determinar as atividades de enzimas ligninolíticas (LiP, MnP, peroxidase, lacase, tirosinase) e produção de biosurfactantes das linhagens crescidas em HAPs;
- Verificar a degradação destes compostos por cromatografia líquida de alta eficiência.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. 1. Linhagens utilizadas

Foram utilizadas 19 linhagens de fungos pertencentes ao Laboratório de Fisiologia e Sistemática Microbiana do Departamento de Ciência de Alimentos – FEA - UNICAMP: 20, LH5, FUS (*Fusarium oxysporum*), LD (*Geotrichum terrestre*); as linhagens Q10 (*Trichocladium canadenses*) e H2 (basidiomiceto) isoladas sob condição anaeróbia por DURRANT *et al.* (1995); 710 (*Achremonium sp*), 870 (*Trichoderma sp*), 984 (*Aspergillus sp*) e 1040 (*Verticillum sp*), provenientes da Reserva Ecológica de Juréia-Itatins entre o Litoral de SP e PR, as quais foram identificadas por CLEMENTE (2002); e as linhagens não identificadas: 480, 490, 582, 756, 801, 837, 897, 1039 e 1051.

4. 2. Manutenção das linhagens e cultivo dos microrganismos

As linhagens de fungos foram cultivadas em tubos de rosca com meio GYP (composto de 2% de glicose; 0,5% de extrato de levedura; 1% de peptona e 1% de Agar) e meio PDA (Agar Batata Dextrose), mantidas refrigeradas de 4-10° C.

As linhagens foram cultivadas a 30° C em placas de Petri contendo GYP ou PDA até atingirem crescimento em toda superfície da placa, estando prontas para o inóculo.

Para o cultivo das linhagens em meio líquido, uma amostra do meio de cultura em placa de 3X1 cm² de área foi transferida, assepticamente, para frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de meio líquido de saís de acordo com a Tabela 1.

4. 3. Condições de cultivo em microaerobiose

4. 3. 1. Meio de cultivo e controles abióticos

Os controles abióticos foram realizados em frascos contendo o meio líquido de sais (Tabela 1) e as respectivas fontes de carbono, porém, sem o inóculo. A incubação ocorreu nas mesmas condições de cultivo das linhagens.

Tabela 1 – Composição do meio líquido básico por Litro (pH 5,5 - 6,0)

Compostos	Concentração por Litro
KH_2PO_4	1,00 g
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,50 g
CaCl_2	0,30 g
L-cisteína – HCl	1,00 g
Risazurina	1,00 mL
Solução de sais ^(*)	1,00 mL
Solução de vitaminas ^(**)	0,5 mL

(*) solução de sais minerais: tartarato de amônio (0,22 g/L); sulfato de manganês (0,66 g/L); sulfato de ferro (0,15 g/L); sulfato de cobalto (0,10 g/L); sulfato de zinco (0,10 g/L); sulfato de cobre (0,64 g/L) e sulfato de alumínio-potássio (10,0 mg/L).

(**) solução de vitaminas: tiamina HCl (5,0 mg/L); biotina (2,0 mg/L); ácido nicotínico (5,0 mg/L); cianocobalamina (0,1 mg/L); ácido fólico (2,0 mg/L); riboflavina (5,0 mg/L); piridoxina - HCl (10,0 mg/L); DL- pantetonato Ca^{+2} (5,0 mg/L) e ácido tiótico (5,0 mg/L).

Obs.: As soluções de sais e de vitaminas foram esterilizadas por filtração em membrana Millipore 0,22 μm e mantidas sob refrigeração de 4-10° C. Posteriormente foram adicionadas a cada Erlenmeyer, obedecendo a concentração indicada na Tabela 1.

Todos os experimentos com as linhagens e seus respectivos controles foram realizados em duplicata.

4. 3. 2. Fontes de carbono

Foram utilizados como fontes de carbono os seguintes compostos: hidrocarbonetos aromáticos policíclicos – naftaleno e fenantreno (0,5% m/v); criseno, perileno, naftol [2,3-a] pireno e decaciclino (0,05% m/v); ácido lignosulfônico e ácido tânico (0,2% m/v).

4. 3. 3. Geração de microaerofilia

Além da redução de oxigênio no meio de cultivo pela presença de L-cisteína-HCl e utilização da rezasurina como corante indicador desta redução, os Erlenmeyers foram incubados em caixa hermeticamente fechada, utilizando-se uma placa de microaerobacter (PROBAC) por 2,5 L de volume de caixa, proporcionando uma atmosfera de microaerobiose (5–15% de O₂ e 10% de CO₂),

As linhagens foram incubadas a 30° C durante 3, 6, 12, 18, 24 e 30 dias.

Após os períodos de incubação, o meio de cultivo com as fontes de carbono e as linhagens crescidas foram centrifugados a 57.770g durante 15 minutos a 4° C e os sobrenadantes foram armazenados sob congelamento a –20° C e utilizados na determinação das enzimas ligninolíticas e produção de biosurfactantes.

4.3.4. Determinação do crescimento das linhagens

Os crescimentos visuais dos fungos para cada dia de cultivo em frascos com as respectivas fontes de carbono foram observados e determinados de acordo com um padrão adaptado da ASTM (American Society for testing materials) Standard Methods G21-90 (1990), apresentando as seguintes faixas de crescimento: ausente (-), pouco crescimento (+), moderado crescimento (+) e ótimo crescimento (+++).

4. 3. 5. Determinação do pH e verificação da alteração de cor do meio de cultivo

Após observação do crescimento das linhagens, foram medidos os valores de pH dos meios de cultivo de cada frasco (em pHmetro MICRONAL, previamente calibrado) e verificou-se as alterações de cores dos meios de cultivo atribuído ao crescimento das linhagens no meio de cultura.

4. 3. 6. Determinação das atividades de enzimas ligninolíticas

4.3.6.1. Lignina-Peroxidase (LiP)

A atividade de lignina-peroxidase foi determinada, segundo TIEN & KIRK (1984), pela oxidação do álcool veratrílico ($\epsilon_{310} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Transferiu-se 0,6 mL de sobrenadante de cultura em cubeta de espectrofotômetro; em seguida, adicionou-se 0,2 mL de H_2O_2 (2mM) e 0,20 mL de álcool veratrílico (2mM) em tampão tartarato de sódio ($0,4 \text{ mol.L}^{-1}$) - pH 3,0-4,0. Acompanhou-se a oxidação do álcool veratrílico pela medida de absorbância a 310nm em espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu (UV-1201) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A unidade de atividade enzimática foi definida como U/L.min.

4.3.6.2. Manganês- Peroxidase (MnP)

A atividade enzimática de manganês-peroxidase foi analisada, segundo KUWAHARA *et al.* (1984 – modificado), através da oxidação do vermelho de fenol ($\epsilon_{610} = 4460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) na presença de Mn^{+2} e peróxido de hidrogênio. Transferiu-se 0,5 mL de sobrenadante de cultura em cubeta de espectrofotômetro; adicionou-se em seguida 0,1 mL de lactato de sódio ($0,25 \text{ mol.L}^{-1}$); 0,2 mL de albumina bovina

(0,5%); 0,05 mL de sulfato de manganês (2mM) e 0,05 mL de peróxido de hidrogênio (2mM) em tampão succinato de sódio (20mM – pH 4,5) e posteriormente 0,1 mL de solução 0,1% de vermelho de fenol.

Cada cubeta foi incubada a 30° C por 5 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 40 µL de NaOH (2N). Em seguida, a absorbância da amostra foi medida em espectrofotômetro UV-VIS a 610 nm. A unidade de atividade enzimática foi definida como U/L.min.

Para controle utilizou-se sobrenadante de cultura tratado durante 30 minutos a 100° C, em lugar da amostra e a reação foi analisada utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente.

4.3.6.3. Peroxidase

A atividade de peroxidase foi determinada de acordo com o método descrito por SZKLARZ *et al.*, (1989 – modificado). Transferiu-se 0,6 mL de caldo enzimático para cubeta de espectrofotômetro; em seguida, adicionou-se 0,1 mL de substrato siringaldazina em etanol (1 mM; $\epsilon_{525} = 65000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); 0,2 mL de tampão citrato fosfato (0,05 mol.L⁻¹) em pH 5,0 e 0,1 mL de peróxido de hidrogênio (2mM). A absorbância foi lida após 10 minutos de reação a temperatura ambiente, em espectrofotômetro UV/VIS em 525 nm, tendo sua atividade enzimática expressa em U/L.min.

4.3.6.4. Lacase

A atividade de lacase foi determinada segundo o método de SZKLARZ *et al.*, (1989 - modificado). Uma amostra de 0,6 mL de sobrenadante do meio de cultura foi transferido para cubeta de espectrofotômetro; em seguida, adicionado 0,1 mL de siringaldazina (1mM) em etanol; 0,2 mL de tampão citrato fosfato (0,05 mol.L⁻¹) em pH 5,0 e 0,1 mL de água destilada.

A oxidação da siringaldazina ($\epsilon_{525} = 65000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) até sua forma quinona foi acompanhada em 10 minutos de reação a temperatura ambiente e tendo sua absorbância lida em espectrofotômetro UV-VIS a 525 nm. A atividade enzimática foi expressa em U/L.min.

4.3.6.5. Tirosinase

A atividade de tirosinase foi determinada segundo SUGUMARAN & BOLTON (1998 – modificado), utilizando-se 0,1 mL de L- tirosina (1,0mM) como substrato: sua oxidação em 0,6 mL de caldo enzimático e 0,2 mL de tampão fosfato (pH 7,0) à dihidroxifenilalanina foi acompanhada pelo aumento da absorbância a 280 nm por 10 minutos a temperatura ambiente, tendo sua atividade expressa em U/L.min.

Todas as atividades enzimáticas foram calculadas de acordo com a equação a seguir, sendo uma unidade de atividade enzimática (U) a oxidação de 1 μmol de substrato por minuto de reação :

$$\text{Atividade enzimática (U/L.min)} = \frac{\Delta \text{ Abs} \times 10^6}{\epsilon \times R \times t}$$

Onde: $\Delta \text{ Abs.}$: abs. final – abs. inicial
 10^6 : conversão de medida para Litro
 ϵ : coeficiente de absorção molar
 R : volume de sobrenadante de cultura
 T : tempo de reação (min)

4. 3. 7. PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES

4. 3. 7. 1. Determinação de emulsificação óleo em água (O/A)

A atividade de emulsificação O/A (Figura 15a) foi determinada segundo CARVALHO et al. (1996). Em tubo de ensaio 16 x 125 mm foram adicionados 3,5 mL caldo de cultura livre de células e 2 mL de tolueno, sendo agitados vigorosamente por 1 minuto em vortex.

A primeira leitura em espectrofotômetro a 610 nm foi realizada antes da agitação e utilizada como branco. Após repouso de 1 hora, realizou-se a segunda leitura. A diferença das densidades óticas detectadas descreveu-se como sendo atividade de emulsificação O/A.

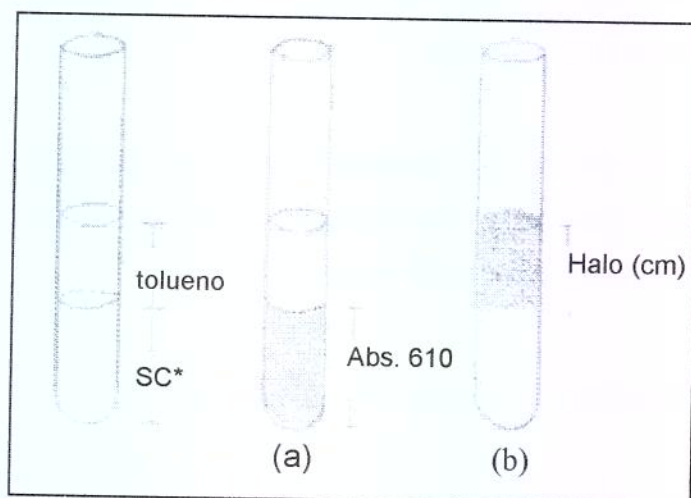


Figura 15 – Formação de emulsões (A) óleo em água e (B) água em óleo por microrganismos
SC* - sobrenadante de cultura

4. 3. 7. 2. Determinação de emulsificação água em óleo (A/O)

Após 24 horas da agitação do tubo contendo tolueno e o caldo de cultura em vortex, mediu-se o halo da emulsão A/O (Figura 15b) em centímetros, segundo COOPER & GOLDENBERG (1987). O tamanho do halo (em centímetros) de emulsificação A/O corresponde à capacidade de estabilidade do bioemulsificante produzido pelas amostras (BRODERICK & COONEY, 1981).

4.4. Seleção das linhagens

Após cada período de incubação em microaerobiose com cada fonte de carbono utilizada, as linhagens foram observadas quanto ao crescimento visual apresentado.

A seleção foi realizada de acordo com os melhores crescimentos para a maioria das fontes de carbono. As linhagens selecionadas foram, então, incubadas em sistema anaeróbio.

4.5. Condições de cultivo em anaerobiose

As linhagens selecionadas anteriormente sob condição microaeróbia foram incubadas com o meio descrito no item 4.3.1, nas mesmas condições de cultivo descritas no item 4.3.3 e com as mesmas fontes de carbono do item 4.3.2, porém utilizando-se jarras herméticas de 2,5 L contendo uma placa de anaerobacter (PROBAC) por jarra e uma fita indicadora (azul de metileno) de redução do O₂ na atmosfera do sistema.

A reação de óxido-redução ocorrida na placa de anaerobiose após acréscimo de água proporcionou um ambiente de 9–13% de CO₂ e ausência de O₂, reduzindo o azul de metileno da fita a azul de leucometileno, incolor.

As observações do crescimento das linhagens foram realizadas após 30 e 40 dias de cultivo, de acordo com o item 4.3.4.

O conteúdo dos Erlenmeyers que apresentaram crescimentos foram centrifugados por 15 minutos a 57770g e 4° C, sendo os sobrenadantes estocados a -20° C para análises enzimáticas e determinação de biosurfactantes.

4. 5. 1. Determinação das atividades de enzimas ligninolíticas

As atividades enzimáticas foram determinadas de acordo com o item 4.3.6.

4.5.2. Produção de biosurfactantes

A verificação de formação de emulsões A/O e O/A foram realizadas de acordo com o item 4.3.7, descrito anteriormente.

4. 6. Degradação dos compostos orgânicos recalcitrantes por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE):

A verificação da porcentagem de degradação dos compostos presentes no sobrenadante das culturas foi realizada por CLAE, comparando-se a área dos picos das amostras com a área dos respectivos controles abióticos, com o objetivo de determinar apenas a degradação qualitativa das fontes de carbono.

Para cada fonte de carbono analisada foram realizadas curvas de calibração com o objetivo de testar a repetibilidade do cromatógrafo. As curvas de calibração foram feitas, utilizando concentrações conhecidas do composto (abscissa) pelas áreas dos picos detectados (ordenada), referente a cada concentração do composto.

O cromatógrafo utilizado foi o modelo Shimadzu C-R7A com coluna de fase reversa Microsorb C18, MV-100 (VARIAN), com tamanho de partículas de 5µm e dimensões de 15 cm x 4,6 mm.

4.6.1. Análise cromatográfica

4.6.1.1. Degradação dos Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

Os HAPs foram extraídos (segundo LAUNEN *et al.*, 1995) com acetato de etila (v/v) em funil de separação. As amostras foram concentradas em evaporador rotatório e ressuspensas em 30 mL de acetonitrila; com injeção de 20 µL no cromatógrafo.

As condições cromatográficas foram: fase móvel acetonitrila : água (70:30 v/v) para naftaleno e fenantreno (injetados em diluição 1:10); vazão de 0,6 mL/min; detecção U.V. a 254 nm.

Para a análise de criseno, perileno e naftol[2,3-a]pireno foi utilizado a mesma fase móvel e o mesmo comprimento de onda para detecção dos picos, porém, na vazão de 1 mL/min.

Para decaciclino, foi utilizada a vazão de 1 mL/min; detecção em U.V. a 254 nm e fase móvel acetonitrila : água na proporção 90:10 (v/v).

4.6.1.2. Degradação do Ácido Lignosulfônico

Para a verificação da degradação do ácido lignosulfônico, injetou-se no cromatógrafo, 20 µL de amostras tratadas do controle e das linhagens, na diluição 1:20 e filtradas em membrana de nitrocelulose 0,22µm.

As condições cromatográficas foram: fase móvel metanol: água (30:70 v/v); fluxo de 0,1 mL/min; detector U.V. em 254 nm.

4. 6. 1. 3. Degradação do Ácido Tânico

O ácido tânico foi extraído (segundo GAATHON *et al*, 1989 – modificado) pelo tratamento de 5 mL do sobrenadante com 5 mL de propanol em heptano (5%). O ácido tânico precipitado foi separado por centrifugação a 57770g por 15 minutos a 4° C. As amostras foram evaporadas sob fluxo de nitrogênio, sendo reconstituídas com 12,5 mL da fase móvel metanol: água (na proporção 30:70 - v/v).

Após este processo, as amostras foram filtradas em membrana de nitrocelulose 0,22µm, sendo injetados 20 µL de cada amostra (diluídas 1:20) no cromatógrafo, utilizando-se as seguintes condições cromatográficas: fase móvel metanol : água (30:70 v/v); vazão de 0,2 mL/min e detector U.V. em 254 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

PARTE I

5.1. CONDIÇÃO MICROAERÓBIA

5.1.1. Naftaleno

5.1.1.1. Crescimento das linhagens em naftaleno

Os crescimentos das linhagens em naftaleno 0,5% (m/v) estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Crescimento das linhagens em **naftaleno** 0,5% (m/v) sob condição microaeróbia.

Linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	pH final
480	+	+	+	+	+	+	5,30
490	+	+	+	+	+	+	4,60
582	+	+	+	+	+	+	5,60
710	+	+	+	+	+	+	5,66
756	+	+	+	+	+	+	5,20
801	+	+	+	+	+	+	5,65
837	+	+	+	+	+	+	5,10
870	-	+	+	+	+	+	6,10
897	-	+	+	+	+	+	5,25
984	+	+	+	+	+	+	5,15
1039	+	+	+	+	+	+	5,60
1040	+	+	+	++	++	++	5,30
1051	+	+	+	+	+	+	5,30
20	+	+	+	+	+	+	4,90
FUS	+	+	+	++	++	++	5,00
H2	+	+	+	+	+	+	6,00
LH5	+	+	+	+	+	+	5,70
LD	+	+	+	+	+	++	6,25
Q10	+	+	+	+	++	++	4,98

(-) ausência de crescimento / (+) pouco crescimento com pequena turvação e fragmentos de micélio partindo do inóculo ou soltos no meio / (++) moderado crescimento com surgimento de “pellet” fino na superfície ou ao fundo, aderido ou não no inóculo / (+++) ótimo crescimento de massa micelial da metade a todo o frasco (adaptado da ASTM Standards G21-90, 1990).

De acordo com a Tabela 2, destacam-se os crescimentos moderados (++) das linhagens 1040 e FUS em naftaleno, a partir do 18º dia de cultivo; a linhagem Q10 a partir do 24º dia e LD em 30 dias de cultivo. Nenhuma linhagem apresentou crescimento ótimo (+++) nesta fonte de carbono e todas elas, com exceção das já mencionadas não apresentaram aumento do crescimento durante o período, fato este, possivelmente ocasionado por um efeito tóxico ao crescimento, devido a uma maior disponibilidade do composto à célula (McNALLY *et al.*, 1999).

Os valores de pH neste período variaram de 4,5 a 6,5 (pH inicial 5,5-6,0), apresentando acidificação decorrente do metabolismo fúngico (INGOLD & HUDSON, 1993). A alteração de cores dos meios de cultivo foi observada para algumas linhagens, de incolor antes da incubação para amarelo (582, 870, 1051, LD), bege (1039, 1040, H2, FUS) e ainda levemente marrom (984), provavelmente, pela presença de produtos de degradação enzimática (MOROHOSHI, 1991) ou reação de tais produtos com o meio de cultivo, originando colorações nos meios.

5.1.1.2. Atividades de enzimas ligninolíticas em naftaleno

➤ Lignina – peroxidase

De acordo com a Tabela 3, observam-se maiores valores de LiP já no 3º dia de cultivo, para as linhagens 801 e LH5 (2,36 e 3,71 U/L.min, respectivamente). A maioria das linhagens não apresentou atividades de LiP durante o período de cultivo.

CLEMENTE *et al.* (2001) determinaram valores inferiores de LiP (até 0,18 U/L.min) em 6 e 10 dias de cultivo, utilizando esta mesma fonte de carbono a 0,5% (m/v) em condição aeróbia.

➤ Manganês – peroxidase

A maioria das linhagens apresentou maiores valores de MnP no 18º dia de cultivo. Porém, as linhagens 480 (26,41U/L.min), 490 (14,21U/L.min), LD (14,53U/L.min) e Q10 (16,25U/L.min), apresentaram maiores atividades de MnP no 24º dia, quando comparadas com as demais linhagens.

As linhagens não produziram atividade de MnP após 3 dias de cultivo contendo naftaleno.

Valores semelhantes aos da maioria das linhagens (Tabela 3) foram obtidos por CLEMENTE *et al.* (1997) utilizando naftaleno 0,5% em sistema aeróbio.

➤ Peroxidase

Com relação aos dados da Tabela 3, a maioria das linhagens apresentou maiores valores de peroxidase nos 12º e 18º dias de cultivo, destacando-se atividades da linhagem 1039 no 12º dia de cultivo (1,17U/L.min), 1051 (0,80 U/L.min) e LD (0,73 U/L.min) no 18º dia.

No 30º dia de cultivo as linhagens já não apresentaram mais atividade de peroxidase, exceto Q10 (0,49 U/L.min).

➤ **Lacase**

A Tabela 4 ilustra que a maioria das linhagens apresentou valores maiores de lacase no 6º dia de cultivo, destacando-se as linhagens 1039, 1051 e FUS com valores de lacase (0,50; 0,96 e 0,86 U/L.min, respectivamente). Os fungos utilizados por CLEMENTE *et al.* (2001) apresentaram, em 6 dias de cultivo, atividades de lacase semelhantes quando cultivados naftaleno 0,5% em sistema aeróbio.

No 30º dia, mais da metade das linhagens não apresentaram atividade de lacase.

➤ **Tirosinase**

A atividade desta enzima foi apresentada pelas linhagens H2 (0,49 U/L.min) no 12º dia e 490 (0,39 U/L.min) no 30º dia de cultivo. Os valores de tirosinase observados na Tabela 4 foram inferiores aos apresentados pelas demais enzimas nesta mesma fonte de carbono.

Em relação às linhagens que apresentaram melhores crescimentos em naftaleno (1040, Q10 e FUS), estas também apresentaram maiores atividades de MnP, peroxidase e lacase, tendo apenas FUS e Q10 apresentado maiores resultados para tirosinase.

5. 1. 1. 3. Atividade de biosurfactantes

Observa-se na Tabela 5, que emulsões O/A (medida pela absorbância a 610 nm) foram produzidas em todos os dias analisados pela maioria das linhagens. Em relação às linhagens que apresentaram melhores crescimentos em naftaleno, FUS e Q10 produziram emulsões A/O (tamanho do halo).

Tabela 3 – Valores da atividade enzimática de lignina-peroxidase, manganês-peroxidase e peroxidase (U/L.min) produzidas pelas linhagens em NAFTALENO 0,5% (m/v), sob microaerobiose.

LiP (U/L.min)							MnP (U/L.min)						
linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	
480	0,18	ND	ND	0,02	0,38	0,28	ND	1,57	ND	12,02	26,41	0,31	
490	ND	ND	ND	0,05	ND	0,18	ND	ND	ND	7,62	14,21	ND	
582	ND	ND	ND	0,26	0,04	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
710	ND	ND	ND	ND	0,18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,21	
756	ND	0,25	ND	ND	ND	ND	ND	1,75	ND	8,74	1,26	0,04	
801	2,36	ND	ND	0,04	ND	ND	ND	ND	ND	4,75	7,26	0,22	
837	0,21	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,88	ND	ND	
870	ND	ND	ND	0,19	ND	ND	ND	ND	ND	5,16	ND	ND	
897	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,43	ND	2,82	1,97	ND	
984	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7,26	ND	2,33	
1039	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6,41	ND	0,63	
1040	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	11,39	7,13	0,13	
1051	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,91	ND	12,38	3,41	0,63	
20	ND	ND	ND	0,09	ND	ND	ND	ND	ND	6,28	ND	ND	
FUS	ND	ND	ND	0,24	0,25	ND	ND	ND	ND	0,85	ND	ND	
H2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12,73	0,45	ND	
LH5	3,71	0,92	ND	0,06	0,04	0,30	ND	1,66	1,6142	5,11	2,56	ND	
LD	ND	0,48	ND	ND	ND	0,03	ND	10,18	ND	14,98	14,53	ND	
Q10	0,26	0,36	0,41	0,32	0,36	ND	ND	2,30	6,00	13,20	16,25	12,21	

Peroxidase (U/L.min)													
linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias
480	ND	0,36	0,16	0,13	ND	ND	1039	ND	0,11	1,17	0,52	0,16	ND
490	ND	0,04	ND	ND	ND	ND	1040	ND	ND	0,37	0,38	ND	ND
582	ND	0,01	0,04	0,25	0,2892	ND	1051	ND	0,42	0,58	0,80	0,04	ND
710	ND	0,69	ND	0,32	0,0435	ND	20	ND	ND	0,52	0,22	0,34	ND
756	0,51	0,01	0,42	0,15	ND	ND	FUS	0,33	ND	0,52	0,49	0,04	ND
801	ND	0,26	0,10	0,39	0,1484	ND	H2	0,04	ND	0,61	0,48	0,05	ND
837	0,21	ND	0,28	0,23	ND	ND	LH5	ND	ND	0,68	0,54	0,12	ND
870	ND	0,23	0,48	0,56	0,1408	ND	LD	ND	0,16	0,55	0,73	0,32	ND
897	ND	ND	0,54	0,30	ND	ND	Q10	ND	0,21	0,25	0,23	0,39	0,49
984	ND	0,53	0,40	0,51	ND	ND	ND – Atividade não-detectada						

Tabela 4– Valores de atividade enzimática das fenoloxidases lacase e tirosinase (U/L.min) produzidas pelas linhagens em NAFTALENO 0,5% (m/v), sob condição microaeróbia.

	Lacase (U/L.min)						Tirosinase (U/L.min)					
linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias
480	0,25	0,19	0,02	ND	0,29	ND	ND	0,23	ND	0,12	0,20	0,02
490	0,12	0,85	ND	ND	0,17	ND	ND	ND	ND	ND	0,12	0,40
582	0,11	ND	0,10	0,25	0,19	ND	ND	ND	ND	0,10	0,21	ND
710	0,02	0,10	0,34	0,16	0,03	0,10	ND	0,01	ND	0,32	0,07	0,03
756	0,21	0,84	0,25	0,06	ND	0,02	ND	ND	ND	ND	ND	ND
801	0,13	0,22	0,33	0,13	0,29	ND	ND	ND	ND	0,04	0,03	ND
837	0,25	0,70	0,18	ND	0,16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
870	ND	0,19	0,64	0,35	0,49	0,14	ND	0,08	ND	0,01	0,01	ND
897	ND	ND	0,59	0,20	0,18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,02
984	ND	0,46	0,22	ND	0,31	ND	ND	ND	ND	0,08	0,02	ND
1039	0,23	0,95	0,42	ND	0,33	0,18	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1040	0,06	0,26	0,38	ND	0,35	ND	ND	0,07	ND	ND	ND	ND
1051	0,14	0,96	0,17	0,05	0,10	ND	ND	ND	ND	0,05	ND	0,06
20	0,43	0,33	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
FUS	0,18	0,86	0,38	0,20	0,32	0,06	ND	0,15	ND	0,15	0,10	ND
H2	0,35	0,41	0,40	ND	0,27	ND	ND	ND	0,49	ND	0,01	ND
LH5	0,18	0,67	0,44	0,33	0,18	0,05	ND	ND	ND	0,08	ND	ND
LD	ND	0,72	0,28	ND	0,52	0,21	ND	ND	ND	0,02	0,02	ND
Q10	0,12	0,19	0,25	0,21	0,26	0,32	0,05	0,09	0,05	0,13	0,11	0,20

ND – Atividade não-detectada

Tabela 5 – Emulsões óleo em água (Abs.) e água em óleo (Halo) produzidas pelas linhagens crescidas em **naftaleno 0,5%**, sob microaerobiose.

Linhagens	3 dias		6 dias		12 dias		18 dias		24 dias		30 dias	
	Abs. ¹	Halo ²	Abs.	Halo	Abs.	Halo	Abs.	Halo	Abs.	Halo	Abs.	Halo
480	0,15	ND	0,01	ND	0,08	ND	ND	ND	0,02	ND	ND	ND
490	0,17	ND	ND	ND	0,02	ND	ND	ND	0,09	ND	ND	ND
582	0,18	ND	0,02	ND	ND	ND	ND	ND	0,06	ND	0,07	ND
710	0,24	ND	0,28	ND	0,12	ND	ND	ND	0,07	ND	0,11	ND
756	0,06	ND	0,11	ND	0,17	0,20	0,08	ND	0,19	0,40	0,08	ND
801	ND	1,00	0,09	ND	0,02	ND	ND	ND	0,01	ND	ND	ND
837	0,17	ND	ND	ND	0,05	0,6	ND	ND	0,09	0,20	ND	ND
870	ND	ND	0,12	ND	0,20	ND	ND	ND	0,06	ND	0,02	ND
897	0,10	ND	0,21	ND	0,02	ND	0,04	ND	0,09	ND	ND	ND
984	ND	ND	0,03	0,30	ND	0,20	ND	0,50	0,01	0,50	0,01	1,50
1039	0,04	ND	0,14	ND	ND	ND	0,06	ND	0,07	ND	0,04	ND
1040	0,15	ND	0,13	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	ND	0,02	ND
1051	0,13	ND	0,25	ND	0,08	ND	ND	ND	0,10	ND	0,04	ND
20	0,29	ND	0,02	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	ND	0,04	ND
FUS	0,17	2,20	0,27	1,80	0,04	1,20	0,05	1,90	0,23	2,00	0,03	1,8
H2	0,17	2,40	0,12	ND	ND	1,0	0,05	ND	0,02	2,00	0,08	ND
LH5	ND	0,50	0,08	ND	0,05	ND	0,19	0,40	0,15	ND	0,06	ND
LD	0,14	2,40	0,15	0,90	0,03	1,70	0,03	ND	ND	ND	0,15	2,00
Q10	0,05	0,50	0,07	0,80	0,06	0,40	ND	0,60	0,06	0,90	0,05	0,40

ND - NÃO DETECTADO

1 - Absorbância lida a 610 nm

2 - Tamanho do halo em centímetros

5. 1. 2. Fenantreno

5. 1. 2. 1. Crescimento das linhagens em fenantreno

Os resultados dos crescimentos visuais das linhagens em fenantreno 0,5% (m/v) estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 – Crescimento das linhagens em **fenantreno** 0,5% (m/v) sob condição microaeróbia.

Linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	pH final
480	+	+	+	+	+	+	4,47
490	+	+	+	+	+	+	4,44
582	+	+	+	+	+	+	5,97
710	+	+	++	++	++	++	5,40
756	+	+	+	+	+	+	5,75
801	+	+	+	+	+	+	5,37
837	+	+	+	+	+	+	4,7
870	+	+	+	+	+	+	4,88
897	+	+	+	+	+	+	2,91
984	+	+	+	+	++	++	5,60
1039	+	+	+	+	+	++	5,73
1040	+	++	+++	+++	+++	+++	4,88
1051	+	+	++	++	++	++	5,18
20	+	+	+	++	++	++	6,32
FUS	+	+	+	+	++	++	5,40
H2	+	+	+	+	+	+	6,30
LH5	+	+	+	+	+	++	5,75
LD	+	+	+	+	++	++	5,70
Q10	+	+	++	++	++	+++	4,58

(+) pouco crescimento com pequena turvação e fragmentos de micélio partindo do inóculo ou soltos no meio / (++) moderado crescimento com surgimento de “pellet” fino na superfície ou ao fundo, aderido ou não no inóculo / (+++) ótimo crescimento de massa micelial da metade a todo o frasco (adaptado da ASTM Standards G21-90, 1990).

De acordo com a Tabela 6, todas as linhagens apresentaram crescimentos em todos os dias analisados. A linhagem 1040 apresentou crescimento ótimo (+++) a partir do 12º dia de cultivo e a linhagem Q10, em 30 dias.

Os crescimentos das linhagens neste HAP (3 anéis) foram superiores aos apresentados em meio contendo naftaleno (2 anéis), ambos na mesma concentração de 0,5% (m/v), devido à uma maior disponibilidade do HAP de menor massa molar à célula do fungo por ser menos insolúvel no meio, podendo causar alguma inibição de crescimento por efeito tóxico (McNALLY *et al.*, 1999).

Algumas linhagens apresentaram acidificação do meio de cultivo no decorrer do período, provavelmente, metabólitos produzidos pelos fungos durante o crescimento.

Os meios de cultivo com as linhagens 480, 870 e FUS apresentaram coloração levemente amarela; 582 apresentou coloração amarelo intenso; 1039, H2 e LD coloração bege e 984, levemente marrom. A mudança de cor dos meios pode ser atribuída, provavelmente, pela presença de produtos de degradação enzimática (MOROHOSHI, 1991) ou reação de tais produtos com o meio de cultivo.

5. 1. 2. 2. Atividades de enzimas ligninolíticas em fenantreno

➤ Lignina – peroxidase

Observa-se na Tabela 7 que as linhagens 20, FUS, LD e Q10 apresentaram atividades em quase todos os dias de cultivo (0,2 – 1,2 U/L.min). Não foram produzidas atividades de LiP pra a maioria das linhagens durante o período de cultivo analisado.

De um modo geral, os resultados desta atividade para fenantreno foram semelhantes aos observados para naftaleno.

CLEMENTE e colaboradores (1997) verificaram atividade de LiP inferiores (0,02 – 0,7 U/L.min) utilizando fenantreno em concentração menor (0,3% m/v) sob sistema aeróbio.

➤ Manganês – peroxidase

De acordo com a Tabela 7, a maioria das linhagens apresentou maiores produções de MnP (1,5 – 23 U/L.min) no 18º dia de cultivo. No 3º dia de cultivo não houve produção de MnP pelas linhagens.

Os valores de atividade desta enzima apresentados para fenantreno foram semelhantes aos observados para naftaleno.

CLEMENTE *et al.* (1997) obtiveram valores de MnP inferiores (1,5 – 8,3 U/L.min) cultivando fungos em fenantreno 0,3% sob aerobiose, em relação aos resultados obtidos neste presente trabalho.

➤ Peroxidase

No 3º dia de cultivo, todas as linhagens apresentaram atividade de peroxidase. A maioria das linhagens apresentou valores aproximados de peroxidase nos primeiros dias de cultivo analisados.

De um modo geral, as linhagens apresentaram diminuição da atividade de peroxidase no decorrer dos dias de cultivo, estando ausente no 30º dia para quase todas elas.

Tais valores de atividades observados foram superiores aos analisados para naftaleno.

➤ **Lacase**

Analisando-se os dados da Tabela 8, observa-se que as linhagens apresentaram maiores valores de lacase no 3º e 6º dias de cultivo (0,11 – 1,06 U/L).

De um modo geral, as linhagens também apresentaram diminuição da atividade de lacase no decorrer dos dias de cultivo, estando ausente no 30º dia para quase todas elas. Os resultados apresentados nesta análise foram semelhantes aos observados para naftaleno.

CLEMENTE e colaboradores (1997) obtiveram valores inferiores de lacase (0,21 – 0,5 U/L.min) para fungos cultivados em 0,3% de fenantreno em aerobiose.

➤ **Tirosinase**

A linhagem 480 apresentou maior produção de tirosinase (1,37 U/L.min) no 24º dia de cultivo. Os valores de atividade de tirosinase apresentados pelas linhagens em meio contendo fenantreno foram discretamente inferiores aos observados em meio contendo naftaleno.

Entre as linhagens que demonstraram melhores crescimentos em fenantreno: a linhagem 1040 apresentou altas atividades de peroxidases e lacase; e a Q10, atividades consideráveis para todas as enzimas.

5. 1. 2. 3. Atividade de biosurfactantes

Observa-se na Tabela 9 que, de um modo geral, emulsões O/A foram apresentadas pela maioria das linhagens em todos os dias analisados.

Tabela 7 – Valores da atividade enzimática de lignina-peroxidase, manganês-peroxidase e peroxidase (U/L.min) produzidas pelas linhagens em FENANTRENO 0,5% (m/v), sob microaerobiose.

LiP (U/L.min)							MnP (U/L.min)						
linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	
480	0,01	ND	ND	0,04	ND	0,01	ND	ND	2,06	19,77	ND	ND	
490	ND	ND	ND	0,03	0,30	0,26	ND	ND	ND	17,26	ND	ND	
582	ND	ND	ND	0,01	0,39	ND	ND	ND	1,30	ND	ND	ND	
710	ND	ND	ND	0,14	0,10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
756	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	23,63	ND	ND	
801	0,28	ND	0,12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	15,34	ND	ND	
837	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,13	0,76	5,65	ND	0,27	
870	ND	0,16	0,27	ND	ND	ND	ND	ND	ND	13,41	ND	0,31	
897	ND	ND	ND	ND	ND	0,17	ND	ND	0,85	23,94	ND	ND	
984	ND	ND	ND	0,01	ND	ND	ND	ND	ND	12,20	ND	ND	
1039	ND	ND	ND	0,02	ND	ND	ND	0,63	ND	8,43	1,61	2,56	
1040	0,14	ND	ND	ND	ND	0,14	ND	7,22	ND	1,93	ND	4,66	
1051	ND	0,18	ND	ND	0,09	0,14	ND	4,71	10,67	1,48	ND	1,17	
20	ND	0,70	ND	ND	0,66	0,76	ND	4,48	ND	1,97	ND	1,39	
FUS	ND	ND	0,05	0,24	0,73	ND	ND	2,24	ND	4,98	5,07	ND	
H2	0,43	ND	ND	0,05	ND	ND	ND	1,57	ND	4,08	ND	0,45	
LH5	ND	ND	0,26	ND	ND	ND	ND	ND	0,04	4,66	ND	ND	
LD	0,11	0,02	1,21	0,28	ND	0,25	ND	1,08	ND	5,74	ND	ND	
Q10	0,11	0,21	0,25	0,32	0,27	0,31	ND	1,35	2,35	3,57	5,32	4,10	

Peroxidase (U/L.min)													
linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias
480	1,19	0,84	0,29	ND	0,01	ND	1039	0,95	0,97	0,77	0,12	0,24	0,10
490	0,81	0,82	0,52	0,013	ND	ND	1040	1,03	1,13	0,65	0,01	0,12	ND
582	1,05	0,49	0,14	ND	0,13	ND	1051	0,57	1,20	0,30	ND	0,04	ND
710	0,79	1,26	0,76	ND	ND	ND	20	0,68	0,84	0,53	ND	ND	ND
756	0,91	0,60	0,23	ND	0,05	ND	FUS	0,39	0,41	0,34	0,13	ND	ND
801	0,16	0,94	0,58	0,08	0,08	ND	H2	0,17	0,18	0,79	0,09	ND	0,05
837	0,82	0,90	0,36	0,24	0,11	ND	LH5	0,76	ND	0,71	ND	0,30	ND
870	0,75	0,87	0,85	0,25	0,27	ND	LD	0,17	0,66	0,73	0,31	ND	ND
897	0,49	0,95	0,61	0,13	ND	ND	Q10	0,45	0,56	0,81	0,90	0,57	0,16
984	0,97	0,87	0,89	0,29	ND	ND	ND – Atividade não detectada						

Tabela 7 – Valores da atividade enzimática de lignina-peroxidase, manganês-peroxidase e peroxidase (U/L.min) produzidas pelas linhagens em FENANTRENO 0,5% (m/v), sob microaerobiose.

linhagens	LiP (U/L.min)						MnP (U/L.min)					
	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias
480	0,01	ND	ND	0,04	ND	0,01	ND	ND	2,06	19,77	ND	ND
490	ND	ND	ND	0,03	0,30	0,26	ND	ND	ND	17,26	ND	ND
582	ND	ND	ND	0,01	0,39	ND	ND	ND	1,30	ND	ND	ND
710	ND	ND	ND	0,14	0,10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
756	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	23,63	ND	ND
801	0,28	ND	0,12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	15,34	ND	ND
837	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,13	0,76	5,65	ND	0,27
870	ND	0,16	0,27	ND	ND	ND	ND	ND	ND	13,41	ND	0,31
897	ND	ND	ND	ND	ND	0,17	ND	ND	0,85	23,94	ND	ND
984	ND	ND	ND	0,01	ND	ND	ND	ND	ND	12,20	ND	ND
1039	ND	ND	ND	0,02	ND	ND	ND	0,63	ND	8,43	1,61	2,56
1040	0,14	ND	ND	ND	ND	0,14	ND	7,22	ND	1,93	ND	4,66
1051	ND	0,18	ND	ND	0,09	0,14	ND	4,71	10,67	1,48	ND	1,17
20	ND	0,70	ND	ND	0,66	0,76	ND	4,48	ND	1,97	ND	1,39
FUS	ND	ND	0,05	0,24	0,73	ND	ND	2,24	ND	4,98	5,07	ND
H2	0,43	ND	ND	0,05	ND	ND	ND	1,57	ND	4,08	ND	0,45
LH5	ND	ND	0,26	ND	ND	ND	ND	ND	0,04	4,66	ND	ND
LD	0,11	0,02	1,21	0,28	ND	0,25	ND	1,08	ND	5,74	ND	ND
Q10	0,11	0,21	0,25	0,32	0,27	0,31	ND	1,35	2,35	3,57	5,32	4,10

linhagens	Peroxidase (U/L.min)						linhagens						
	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias		3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias
480	1,19	0,84	0,29	ND	0,01	ND	1039	0,95	0,97	0,77	0,12	0,24	0,10
490	0,81	0,82	0,52	0,013	ND	ND	1040	1,03	1,13	0,65	0,01	0,12	ND
582	1,05	0,49	0,14	ND	0,13	ND	1051	0,57	1,20	0,30	ND	0,04	ND
710	0,79	1,26	0,76	ND	ND	ND	20	0,68	0,84	0,53	ND	ND	ND
756	0,91	0,60	0,23	ND	0,05	ND	FUS	0,39	0,41	0,34	0,13	ND	ND
801	0,16	0,94	0,58	0,08	0,08	ND	H2	0,17	0,18	0,79	0,09	ND	0,05
837	0,82	0,90	0,36	0,24	0,11	ND	LH5	0,76	ND	0,71	ND	0,30	ND
870	0,75	0,87	0,85	0,25	0,27	ND	LD	0,17	0,66	0,73	0,31	ND	ND
897	0,49	0,95	0,61	0,13	ND	ND	Q10	0,45	0,56	0,81	0,90	0,57	0,16
984	0,97	0,87	0,89	0,29	ND	ND	ND – Atividade não-detectada						

Tabela 8— Valores de atividade enzimática das fenoloxidasases lacase e tirosinase (U/L.min) produzidas pelas linhagens em FENANTRENO 0,5% (m/v), sob condição microaeróbia.

	Lacase (U/L.min)						Tirosinase (U/L.min)					
linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias
480	0,52	0,36	0,18	ND	0,42	ND	ND	ND	ND	0,02	1,37	ND
490	0,35	0,89	0,28	ND	0,37	ND	ND	ND	ND	0,01	ND	ND
582	0,43	0,22	0,23	0,18	ND	ND	ND	ND	ND	0,06	0,17	ND
710	0,26	0,56	0,36	0,12	ND	0,19	ND	ND	ND	0,08	0,48	ND
756	0,39	0,22	0,056	ND	0,07	ND	ND	ND	0,10	0,08	0,06	ND
801	0,38	0,77	0,39	ND	0,20	ND	ND	ND	ND	ND	0,01	ND
7837	0,28	1,07	0,38	ND	0,40	ND	ND	ND	ND	ND	0,06	ND
870	ND	0,55	ND	ND	0,30	ND	ND	ND	ND	0,26	0,06	0,21
897	ND	0,11	0,20	ND	0,13	ND	ND	ND	0,15	0,14	0,10	0,15
984	0,12	0,41	0,15	ND	0,25	ND	ND	0,01	ND	0,02	0,03	ND
1039	0,11	ND	0,55	ND	0,19	ND	ND	ND	ND	ND	0,02	ND
1040	0,50	0,60	0,17	ND	0,22	ND	ND	ND	ND	0,02	ND	ND
1051	ND	0,79	0,19	ND	0,19	ND	ND	ND	ND	0,02	0,04	ND
20	0,48	0,25	0,18	ND	ND	0,13	ND	ND	ND	0,07	ND	ND
FUS	0,52	0,20	0,28	0,21	0,29	ND	ND	ND	ND	0,08	0,20	ND
H2	0,49	0,72	0,36	ND	0,04	ND	ND	ND	0,03	0,27	0,03	ND
LH5	0,54	0,46	0,25	ND	0,35	ND	ND	ND	ND	0,08	0,03	ND
LD	0,53	0,32	0,32	ND	0,26	ND	ND	ND	ND	0,08	0,08	ND
Q10	0,52	0,46	0,31	0,29	0,54	0,45	ND	0,11	0,21	0,09	0,20	0,26

ND – Atividade não-detectada

5. 1. 3. Criseno

5. 1. 3. 1. Crescimento das linhagens em criseno

Os crescimentos das linhagens em criseno 0,05% (m/v) estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10 – Crescimento das linhagens em criseno 0,05% (m/v) sob condição microaeróbia.

Linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	pH final
480	-	+	++	++	++	++	4,60
490	-	+	+	+	+	+	4,19
582	+	+	++	++	++	++	5,40
710	+	+	++	++	++	++	4,49
756	+	+	++	++	++	++	4,50
801	+	++	++	++	++	++	2,78
837	-	+	+	+	+	+	4,34
870	-	+	+	+	++	++	3,79
897	-	+	+	+	+	+	5,93
984	-	+	+	+	+	+	3,60
1039	+	+	+	+	+	+	3,41
1040	+	++	+++	+++	+++	+++	3,06
1051	+	+	++	++	++	++	4,47
20	+	+	++	++	++	++	4,61
FUS	+	++	++	++	++	++	3,40
H2	+	+	++	++	++	++	5,45
LH5	-	+	+	+	+	+	5,50
LD	-	+	+	+	+	++	6,64
Q10	+	+	++	++	++	+++	4,50

(-) ausência de crescimento / (+) pouco crescimento com pequena turvação e fragmentos de micélio partindo do inóculo ou soltos no meio / (++) moderado crescimento com surgimento de "pellet" fino na superfície ou ao fundo, aderido ou não no inóculo / (+++) ótimo crescimento de massa micelial da metade à todo o frasco (adaptado da ASTM Standards G21-90, 1990).

Em relação aos crescimentos observados na Tabela 10, a linhagem 1040 apresentou crescimento ótimo (+++) a partir do 12º dia de cultivo, bem como a linhagem Q10, no 30º dia de cultivo.

Os valores de pH de todas as linhagens apresentaram-se ácidos na medida em que houve aumento de crescimento. Algumas linhagens apresentaram valores de pH em torno de 2,5 - 3,5 (801, 984, 1039, 1040 e FUS).

Nenhuma linhagem apresentou mudança de coloração do meio de cultivo no período analisado.

5. 1. 3. 2. Atividades de enzimas ligninolíticas em criseno

➤ Lignina – peroxidase

De acordo com a Tabela 11, pode-se verificar que as linhagens 20 e Q10 apresentaram maiores valores de LiP em relação às demais linhagens, a partir do 6º até o 30º dia de cultivo (2,75 - 7,64 U/L.min e 0,16 - 0,54 U/L.min, respectivamente). A linhagem FUS apresentou alta atividade no 30º dia (4,98 U/L.min).

Não foi detectada atividade de LiP após o 3º dia de cultivo das linhagens em meio contendo criseno.

De acordo com EICHLEROVA e colaboradores (2000), isolados de basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* não produziram atividade de LiP quando crescidos em mistura de HAPs de 3 a 5 anéis benzênicos sob aerobiose.

➤ Manganês – peroxidase

Analisando-se a Tabela 11, as linhagens 984, 837, 1039 e Q10 apresentaram maiores valores de MnP no decorrer do período de cultivo, destacando-se as linhagens 984 e Q10 com atividades de 4,13 e 1,90 U/L.min, respectivamente, no 24º dia de cultivo; e as linhagens 837 e 1039 com atividade de 3,32 e 2,96 U/L.min, respectivamente, em 18 dias de cultivo.

Não foi detectada atividade de MnP após o 3º dia de cultivo em meio contendo criseno. As linhagens 480, 582, 710, 756, 801, 870, 1051 e FUS não produziram atividade detectável de MnP no 30º dia de cultivo.

EICHLEROVÁ e colaboradores (2000) cultivaram fungos de degradação branca em meio contendo criseno em sistema aeróbio e obtiveram atividade de MnP bem superiores aos obtidos neste trabalho.

➤ Peroxidase

As linhagens 870, 1051, Q10 e LD se destacaram em relação à maior atividade de peroxidase em quase todos os dias analisados. A linhagem 870 apresentou atividade de peroxidase igual a 0,19 U/L.min no 24º dia de cultivo; a linhagem 1051 mostrou 0,21 U/L.min no 6º dia, enquanto que a linhagem Q10 apresentou 0,12 U/L.min

no período de 18° ao 30° dia. A linhagem LD apresentou atividade de peroxidase em meio de cultivo contendo criseno igual a 0,23 U/L.min e 0,14 U/L.min no 24° e 30° dias, respectivamente.

Não foi detectado atividade de peroxidase após 3 dias de cultivo em meio contendo criseno, com exceção das linhagens FUS e Q10. As linhagens 480, 582, 756, 801 e LH5 não produziram atividades detectáveis de peroxidase no 30° dia de cultivo.

➤ **Lacase**

Analisando-se a Tabela 12, observa-se que as linhagens 870, H2 e Q10 apresentaram melhores atividades de lacase (18° dia – 0,26 U/L.min; 24° dia – 0,41U/L.min e 30° dia – 0,16U/L.min; respectivamente). Um pico de atividade no 24° dia foi obtido para H2 (0,41 U/L.min). Não foi detectado atividade de lacase no 30° dia para as linhagens estudadas, com exceção das linhagens LH5 e Q10.

➤ **Tirosinase**

As maiores atividades desta enzima foram obtidas com as linhagens 582 (0,80 U/L.min - 12° dia); bem como as linhagens 1051, 20 e FUS (0,72; 0,70 e 0,62 U/L.min, respectivamente no 6° dia). As linhagens 756, 897 e LD não produziram atividade de tirosinase em meio contendo criseno no 30° dia de cultivo.

Em relação às linhagens que apresentaram melhores crescimentos em criseno (1040 e Q10), apenas a linhagem Q10 apresentou atividades de todas as enzimas testadas em todos os dias de cultivo.

5.1.3.3. Atividade de biosurfactantes

De acordo com a Tabela 13, observa-se que não houve a produção de biosurfactantes após 3 dias de cultivo e poucas linhagens apresentaram tal atividade nos demais dias. Todas as linhagens apresentaram emulsão O/A no 12° dia de cultivo, com exceção de H2 e LH5. Em relação aos melhores crescimentos em criseno, a linhagem 1040 apresentou emulsão O/A; e Q10, emulsão A/O. No entanto, as linhagens 582 e 897 apresentaram melhores resultados para esta última emulsão.

Tabela 11 – Valores da atividade enzimática de lignina-peroxidase, manganês-peroxidase e peroxidase (U/L.min) produzidas pelas linhagens em CRISNO 0,05% (m/v), sob condição microaeróbia.

LiP (U/L.min)							MnP (U/L.min)						
linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	
480	ND	0,04	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
490	ND	ND	ND	ND	0,45	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,72	
582	ND	ND	0,53	0,04	ND	0,10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
710	ND	0,04	ND	ND	0,13	0,03	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
756	ND	0,09	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
801	ND	0,12	ND	0,02	ND	0,02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
837	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,32	1,03	ND	ND	
870	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
897	ND	0,14	ND	ND	ND	ND	ND	0,90	ND	ND	ND	ND	
984	ND	ND	ND	0,02	0,13	ND	ND	ND	0,76	ND	4,13	ND	
1039	ND	ND	0,04	0,21	ND	0,11	ND	ND	ND	2,96	ND	ND	
1040	ND	0,36	ND	0,02	0,02	0,11	ND	ND	ND	ND	0,22	ND	
1051	ND	ND	0,17	ND	0,32	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
20	ND	3,60	7,64	7,55	3,40	2,75	ND	ND	0,76	ND	ND	ND	
FUS	ND	ND	ND	0,12	ND	4,98	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
H2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,85	0,04	
LH5	ND	0,11	0,21	0,19	0,11	0,10	ND	ND	0,23	0,40	0,51	0,23	
LD	ND	ND	0,01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,08	1,84	0,04	
Q10	ND	0,16	0,42	0,54	0,52	0,30	ND	0,52	1,20	1,70	1,90	0,86	

Peroxidase (U/L.min)													
linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias
480	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1039	ND	ND	ND	0,06	ND	ND
490	ND	ND	ND	ND	ND	0,17	1040	ND	ND	ND	0,06	0,03	ND
582	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1051	ND	0,21	0,05	0,20	0,02	ND
710	ND	ND	ND	ND	ND	0,02	20	ND	ND	0,13	ND	ND	ND
756	ND	ND	ND	ND	ND	ND	FUS	0,02	ND	0,03	ND	ND	ND
801	ND	ND	ND	ND	ND	ND	H2	ND	0,06	0,07	ND	0,09	0,04
837	ND	ND	0,13	ND	ND	ND	LH5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
870	ND	0,16	0,02	0,17	0,19	ND	LD	ND	0,02	0,04	ND	0,23	0,14
897	ND	0,06	ND	ND	ND	ND	Q10	0,05	0,07	0,06	0,12	0,12	0,12
984	ND	ND	ND	0,03	ND	ND	ND – Atividade não-detectada						

Tabela 12 – Valores de atividade enzimática das fenoloxidasas lacase e tirosinase (U/L.min) produzidas pelas linhagens em CRISENO 0,05% (m/v), sob condição microaeróbia.

linhagens	Lacase (U/L.min)						Tirosinase (U/L.min)					
	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias
480	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,08	ND	ND
490	ND	0,04	ND	0,12	0,03	ND	ND	ND	0,06	0,14	0,06	ND
582	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,80	ND	ND	ND
710	ND	ND	0,06	0,14	ND	ND	ND	ND	0,01	0,12	ND	ND
756	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
801	ND	ND	ND	ND	0,12	ND	ND	ND	0,07	ND	0,40	ND
837	ND	ND	ND	0,21	0,12	ND	ND	ND	0,11	0,02	ND	ND
870	ND	0,19	0,07	0,26	0,08	ND	ND	0,32	ND	ND	ND	ND
897	ND	0,19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
984	ND	ND	ND	ND	0,03	ND	ND	ND	0,02	ND	0,54	0,26
1039	ND	ND	ND	0,20	0,09	ND	ND	ND	0,03	0,10	ND	ND
1040	0,20	0,06	ND	0,04	ND	ND	ND	ND	0,01	ND	ND	ND
1051	ND	0,01	ND	0,03	0,11	ND	0,26	0,72	0,07	0,16	0,35	ND
20	ND	ND	0,05	ND	ND	ND	0,29	0,70	ND	ND	ND	ND
FUS	ND	ND	0,03	ND	ND	ND	ND	0,62	0,03	ND	0,09	ND
H2	0,05	0,09	0,12	0,14	0,41	ND	ND	0,28	0,59	ND	0,58	ND
LH5	ND	0,03	0,05	0,06	0,09	0,12	ND	0,02	0,03	0,03	0,03	0,30
LD	ND	0,02	ND	0,09	0,09	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Q10	0,05	0,12	0,13	0,09	0,10	0,16	0,03	0,06	0,12	0,16	0,21	0,28

ND- Atividade não-detectada

Tabela 13 – Emulsões óleo em água (Abs.) e água em óleo (Halo) produzidas pelas linhagens crescidas em **criseno 0,05%**, sob condição microaeróbia.

Linhagens	3 dias		6 dias		12 dias		18 Dias		24 dias		30 dias	
	Abs. ¹	Halo ²	Abs.	Halo	Abs.	Halo	Abs.	Halo	Abs.	Halo	Abs.	Halo
480	ND	ND	0,06	ND	0,07	ND	0,01	ND	0,16	ND	ND	ND
490	ND	ND	0,03	ND	0,025	ND	0,03	ND	0,05	ND	ND	ND
582	ND	ND	0,03	0,10	0,05	0,40	0,02	1,20	0,06	1,60	0,04	1,50
710	ND	ND	0,07	ND	0,20	ND	0,10	ND	0,02	ND	ND	ND
756	ND	ND	ND	ND	0,26	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
801	ND	ND	ND	ND	0,02	ND	ND	ND	0,07	0,40	ND	ND
837	ND	ND	0,04	ND	0,24	ND	ND	ND	0,05	ND	0,08	ND
870	ND	ND	0,03	ND	0,05	ND	0,08	0,30	0,16	0,30	ND	ND
897	ND	ND	0,23	0,50	0,42	0,50	ND	0,90	ND	0,80	ND	0,80
984	ND	ND	ND	ND	0,05	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1039	ND	ND	0,01	ND	0,23	ND	ND	ND	0,145	ND	ND	ND
1040	ND	ND	0,05	ND	0,10	ND	0,10	ND	0,01	ND	0,70	ND
1051	ND	ND	0,02	ND	0,15	ND	0,04	0,80	0,14	ND	ND	ND
20	ND	ND	ND	ND	0,12	ND	ND	0,50	0,02	0,20	0,30	0,50
FUS	ND	ND	0,02	ND	0,04	ND	0,06	ND	0,04	0,30	ND	ND
H2	ND	ND	ND	0,30	ND	0,40	0,01	ND	ND	ND	ND	ND
LH5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LD	ND	ND	ND	ND	0,04	ND	0,02	0,3	ND	0,60	ND	1,50
Q10	ND	ND	ND	0,40	0,13	0,90	0,06	1,20	0,05	0,20	ND	0,50

ND – NÃO DETECTADO

1 – Absorbância lida a 610 nm

2- Tamanho do halo em centímetros

5. 1. 4. Perileno

5. 1. 4. 1. Crescimento das linhagens perileno

Os crescimentos das linhagens em perileno 0,05% (m/v) estão apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14 – Crescimento das linhagens em **perileno** 0,05% (m/v) sob condição microaeróbia.

Linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	pH final
480	+	+	+	+	+	+	4,00
490	-	+	+	+	+	+	4,20
582	-	+	+	+	+	+	4,50
710	+	++	++	+++	+++	+++	4,80
756	+	+	+	+	+	+	4,55
801	-	+	+	+	++	++	4,00
837	+	+	+	+	+	+	4,35
870	+	+	+	+	+	+	3,80
897	+	+	+	+	+	+	4,95
984	-	+	+	+	++	++	3,80
1039	+	+	+	+	+	+	5,50
1040	+	++	++	++	+++	+++	3,00
1051	+	+	+	+	+	+	4,60
20	+	+	+	+	+	+	5,80
FUS	+	+	+	+	++	++	6,20
H2	+	+	+	+	++	++	5,65
LH5	+	+	+	++	+	+	5,20
LD	+	+	++	++	+	+	5,90
Q10	++	++	++	+++	+++	+++	4,80

(-) ausência de crescimento / (+) pouco crescimento com pequena turvação e fragmentos de micélio partindo do inóculo ou soltos no meio / (++) moderado crescimento com surgimento de "pellet" fino na superfície ou ao fundo, aderido ou não no inóculo / (+++) ótimo crescimento de massa micelial da metade à todo o frasco (adaptado da ASTM Standards G21-90, 1990).

A Tabela 14 ilustra que as linhagens 710 e Q10 apresentaram crescimentos ótimos (+++) a partir do 18º dia de cultivo, assim como a linhagem 1040 a partir do 24º dia de cultivo no meio contendo perileno.

Os crescimentos em perileno foram pouco inferiores aos apresentados para criseno (HAPs de mesma concentração 0,05% m/v).

Na medida em que as linhagens apresentavam crescimento, a maioria dos meios de cultivo tornaram-se mais ácidos, com faixas de pH variando entre 3,0 – 4,5. A acidificação dos meios de cultivo pode proporcionar a ativação de enzimas ligninolíticas (LiP, MnP, lacase), uma vez que estas atuam otimamente em ambientes ácidos (TIEN & KIRK, 1984; KUWAHARA *et al.*, 1984; KIRK & FARRELL, 1987; SZKLARZ *et al.*, 1989).

As linhagens não apresentaram mudança de coloração durante o período de incubação, o que pode ser justificado, provavelmente, pela assimilação dos produtos de degradação (os quais originam cores nos meios ou reagem com algum componente do meio de cultura, produzindo cor) juntamente com a fonte de carbono.

5. 1. 4. 2. Atividades de enzimas ligninolíticas em perileno

➤ Lignina – peroxidase

Observando-se a Tabela 15, no 6º e 18º dias de cultivo não houve produção de LiP pela maioria das linhagens. As linhagens 897 e 1040 apresentaram maiores valores de LiP no 3º dia (2,75 e 1,07 U/L.min, respectivamente). Observa-se também, um pico enzimático no 18º dia de cultivo para a linhagem LD (2,71 U/L).

De uma maneira geral, para a maioria das linhagens os valores de atividade de LiP apresentados são discretamente superiores aos detectados no meio contendo criseno, com exceção, principalmente, das linhagens 20 e Q10 que apresentaram consideráveis valores de atividade de LiP utilizando criseno como fonte de carbono.

➤ Manganês – peroxidase

Analisando-se a Tabela 15, as linhagens apresentaram maiores atividades de MnP no 6º e 12º dias de cultivo, sendo superiores aos analisados para criseno.

As linhagens 984 (28,07 U/L.min), 1039 (33,50 U/L.min) e FUS (27,76 U/L.min) destacaram-se quanto à produção de MnP no 12º dia de cultivo.

➤ Peroxidase

Todas as linhagens apresentaram atividade a partir do 18º dia de cultivo, aumentando nos últimos dias de cultivos analisados (24º e 30º dias), exceto para a linhagem FUS. Os resultados de peroxidase apresentados em meio contendo perileno foram superiores aos apresentados em meio contendo criseno.

➤ Lacase

Observa-se na Tabela 16 que a maioria das linhagens apresentaram atividade de lacase no 30º dia de cultivo, sendo que a linhagem Q10 apresentou atividade desta enzima em todos os dias de cultivo. A linhagem FUS apresentou melhores atividades no 6º (0,25 U/L.min), 12º (0,27 U/L.min) e 30º dia de cultivo (0,31 U/L.min).

➤ **Tirosinase**

Observa-se na Tabela 16, que a maioria das linhagens não apresentaram atividade de tirosinase para esta fonte de carbono, exceto no 18º dia de cultivo, onde observa-se que apenas a linhagem 801 não apresentou atividade de tirosinase.

A linhagem 20 apresentou melhor atividade enzimática no 12º dia de cultivo (5,32 U/L.min). Os resultados apresentados para perileno foram discretamente superiores aos apresentados para criseno, pela maioria das linhagens estudadas.

Em relação às linhagens que apresentaram melhores crescimentos nesta fonte de carbono (710, 1040 e Q10) foi verificada baixa atividade de LiP e lacase para a linhagem 710; e LiP, para a linhagem 1040. O crescimento destas linhagens que apresentaram baixos valores enzimáticos em meio contendo perileno podem estar relacionados, talvez, com a participação de outras enzimas mais específicas que são ativadas sob este sistema de baixa oxigenação. Pode-se questionar, ainda, a participação de enzimas intracelulares (DE JONG *et al.*, 1993; WANG & YU, 1998), incluindo entre elas a monooxigenase citocromo P-450 (BEZALEL *et al.*, 1996 e 1997; HARAYAMA, 1997) e ou enzimas ligadas à membrana celular (transmembrana- metil-transferases e outras enzimas de potencial de óxido-redução (CAMERON *et al.*, 2000).

Não houve comparação de atividades de enzimas ligninolíticas em perileno pela ausência de dados na literatura.

5.1.4.3. Atividade de biosurfactantes

Assim como para criseno, a maioria das linhagens produziu emulsão O/A em todos os dias de cultivo para perileno. As linhagens 984 e H2 apresentaram altos valores de emulsão A/O. Em relação às linhagens que apresentaram melhores crescimentos, 710 e 1040 apresentaram emulsão O/A; e Q10, emulsão A/O para todos os dias de cultivo.

Tabela 15 – Valores da atividade enzimática de lignina-peroxidase, manganês-peroxidase e peroxidase (U/L.min) produzidas pelas linhagens em PERILENO 0,05% (m/v), sob condição microaeróbia.

LiP (U/L.min)							MnP (U/L.min)						
linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	
480	ND	ND	0,04	ND	ND	0,01	ND	3,05	19,24	ND	ND	ND	
490	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,59	1,39	ND	ND	ND	
582	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	ND	1,70	0,31	ND	3,00	0,09	
710	0,06	ND	0,06	ND	ND	0,02	ND	2,33	15,43	ND	ND	ND	
756	ND	ND	0,04	ND	0,19	0,04	ND	7,85	5,34	ND	ND	0,36	
801	ND	ND	ND	ND	0,32	ND	ND	21,84	5,38	ND	ND	ND	
837	0,08	ND	0,04	ND	ND	0,13	ND	13,68	ND	ND	ND	0,27	
870	0,64	ND	0,02	ND	0,01	0,13	ND	4,62	20,63	ND	ND	ND	
897	2,75	ND	0,14	ND	0,21	0,11	ND	6,14	17,04	ND	ND	ND	
984	ND	ND	ND	ND	0,09	0,01	4,48	10,45	28,07	ND	ND	ND	
1039	ND	0,04	ND	ND	0,27	ND	ND	10,54	33,50	ND	ND	2,02	
1040	1,07	ND	0,06	ND	0,47	0,10	2,56	3,09	11,61	ND	ND	3,09	
1051	0,26	ND	0,36	ND	0,04	0,01	0,13	7,13	11,03	1,39	ND	ND	
20	0,13	ND	0,07	ND	0,57	0,17	1,03	8,25	20,31	ND	ND	ND	
FUS	0,44	ND	ND	0,04	0,91	0,40	ND	12,29	27,76	ND	ND	ND	
H2	0,06	ND	0,31	ND	ND	ND	ND	8,25	12,64	ND	9,06	0,04	
LH5	ND	ND	0,19	ND	0,05	0,14	ND	4,39	20,90	0,72	2,33	0,45	
LD	ND	ND	0,01	2,71	0,22	0,10	ND	12,69	11,84	ND	ND	ND	
Q10	ND	0,13	0,22	0,31	0,22	0,51	2,54	5,50	6,54	10,47	9,51	11,50	

Peroxidase (U/L.min)													
linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias
480	0,06	ND	ND	0,03	0,17	0,54	1039	0,04	ND	0,1088	0,13	0,28	0,39
490	ND	ND	0,11	0,12	0,10	0,39	1040	ND	ND	ND	0,19	0,14	0,29
582	ND	0,41	ND	0,06	0,04	0,08	1051	ND	ND	ND	0,15	0,13	0,36
710	ND	ND	ND	0,08	0,25	0,50	20	ND	0,20	ND	0,23	0,28	0,41
756	ND	ND	ND	0,20	0,24	0,50	FUS	ND	0,35	ND	0,23	0,25	0,23
801	ND	ND	ND	0,03	0,06	0,50	H2	ND	0,14	ND	0,25	0,40	0,45
837	ND	0,05	ND	0,06	0,32	0,40	LH5	0,01	0,08	ND	0,45	0,23	0,62
870	0,01	ND	0,04	0,21	0,23	0,38	LD	ND	ND	ND	0,10	0,19	0,52
897	0,18	0,04	ND	0,01	0,21	0,40	Q10	0,06	0,13	0,21	0,25	0,36	0,45
984	ND	ND	ND	0,10	0,25	0,40		ND- Atividade não-detectada					

ND- Atividade não-detectada

Tabela 16 – Valores de atividade enzimática das fenoloxidasas lacase e tirosinase (U/L.min) produzidas pelas linhagens em PERILENO 0,05% (m/v), sob condição microaeróbia.

	Lacase (U/L.min)						Tirosinase (U/L.min)					
	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias
linhagens												
480	ND	0,16	ND	ND	0,09	0,16	0,31	ND	ND	0,07	0,01	ND
490	0,05	0,17	ND	ND	ND	0,19	1,47	ND	ND	0,14	ND	ND
582	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,24	ND	ND
710	ND	0,04	ND	ND	ND	0,06	ND	ND	ND	0,05	ND	ND
756	ND	0,30	ND	ND	ND	0,08	ND	ND	ND	0,23	ND	ND
801	ND	ND	ND	ND	0,09	0,05	ND	ND	ND	ND	ND	ND
837	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,29	ND	ND	0,10	ND	0,04
870	ND	ND	ND	ND	ND	0,19	0,27	ND	ND	0,02	ND	ND
897	ND	0,11	ND	ND	ND	0,24	ND	ND	ND	0,19	0,49	ND
984	ND	0,06	ND	ND	ND	0,02	ND	ND	ND	0,04	ND	ND
1039	0,04	0,13	ND	ND	ND	0,18	ND	0,18	ND	0,09	ND	ND
1040	ND	0,01	ND	ND	ND	0,07	ND	ND	ND	0,02	0,10	0,08
1051	ND	0,10	ND	ND	ND	0,16	ND	ND	ND	0,10	ND	ND
20	ND	0,13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5,32	0,06	ND	ND
FUS	ND	0,25	0,27	ND	0,03	0,31	ND	ND	ND	0,16	ND	0,02
H2	ND	ND	ND	0,02	0,14	0,15	ND	ND	ND	0,18	ND	ND
LH5	ND	0,20	0,07	ND	ND	0,05	ND	ND	ND	0,14	ND	0,30
LD	ND	ND	0,17	ND	ND	0,22	ND	ND	ND	0,09	ND	ND
Q10	0,10	0,16	0,20	0,15	0,17	0,22	ND	ND	0,05	0,09	0,23	0,26

ND – Atividade não-detectada

Tabela 17 – Emulsões óleo em água (Abs.) e água em óleo (Halo) produzidas pelas linhagens crescidas em **perileno 0,05%**, sob micraerobiose.

Linhagens	3 dias		6 Dias		12 dias		18 dias		24 dias		30 dias	
	Abs. ¹	Halo ²	Abs.	Halo	Abs.	Halo	Abs.	Halo	Abs.	Halo	Abs.	Halo
480	ND	ND	0,04	ND	ND	ND	0,05	ND	ND	ND	0,04	ND
490	ND	0,20	0,02	ND	0,60	0,20	ND	0,20	0,01	0,20	ND	0,10
582	ND	ND	ND	ND	0,03	ND	ND	ND	0,01	ND	0,02	ND
710	0,07	0,10	0,04	0,20	0,03	ND	0,25	ND	0,03	ND	0,03	ND
756	0,01	0,30	0,02	ND	0,02	0,30	ND	0,10	0,12	0,20	0,01	1,50
801	ND	0,10	0,04	ND	ND	ND	0,01	ND	0,01	ND	ND	ND
837	0,03	ND	0,05	ND	ND	ND	0,02	ND	0,02	ND	0,01	0,20
870	0,06	ND	0,03	ND	0,1	ND	0,05	ND	ND	0,20	0,03	0,30
897	0,01	ND	0,03	ND	ND	ND	0,02	ND	0,02	0,30	ND	0,50
984	ND	1,00	0,01	0,9	ND	1,10	0,20	1,00	ND	1,00	ND	1,00
1039	0,05	ND	0,06	ND	0,05	ND	ND	ND	ND	ND	0,04	ND
1040	0,03	ND	0,02	ND	0,02	ND	0,05	ND	ND	ND	0,02	ND
1051	0,10	ND	0,15	0,40	ND	0,30	0,10	0,30	0,02	ND	0,03	0,30
20	0,05	0,20	ND	0,50	0,01	0,30	0,06	0,20	0,02	ND	0,02	0,30
FUS	0,02	ND	0,14	ND	0,02	ND	0,01	ND	0,05	ND	0,08	ND
H2	ND	1,20	0,02	0,80	ND	0,30	0,17	0,80	0,05	1,20	0,05	1,20
LH5	0,02	0,30	0,05	0,20	0,02	0,60	0,10	1,00	0,19	1,20	0,03	0,30
LD	ND	0,30	0,2	ND	0,01	ND	0,17	ND	0,05	ND	0,09	0,40
Q10	0,01	0,20	0,05	0,40	0,05	0,70	0,04	0,80	0,06	1,00	0,05	0,50

ND - NÃO DETECTADO

1 - Absorbância lida a 610 nm

2 - Tamanho do halo em centímetros

5. 1. 5. Naftol [2,3-a] pireno

5. 1. 5. 1. Crescimento das linhagens em naftol[2,3-a]pireno

As linhagens apresentaram crescimentos em naftol [2,3-a] pireno 0,05% (m/v) de acordo com a Tabela 18.

Tabela 18 – Crescimento das linhagens em naftol [2,3-a] pireno 0,05% (m/v) sob condição microaeróbia

Linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	pH final
480	+	+	++	++	++	++	3,90
490	-	+	+	+	+	+	3,80
582	+	+	++	++	++	++	3,78
710	+	++	++	++	++	++	4,35
756	+	++	++	++	++	++	4,20
801	+	++	++	++	++	++	3,90
837	-	+	+	+	+	+	3,90
870	+	+	+	+	+	++	3,80
897	-	+	+	+	+	+	4,25
984	+	+	+	++	++	++	3,20
1039	+	++	++	++	++	++	4,00
1040	++	+++	+++	+++	+++	+++	2,90
1051	+	+	+	+	+	+	3,80
20	-	+	++	++	++	++	6,40
FUS	+	++	+++	+++	+++	+++	4,40
H2	+	+	++	++	++	++	5,40
LH5	-	+	+	+	+	+	6,10
LD	+	++	++	++	++	++	5,75
Q10	++	++	++	++	++	++	2,80

(-) ausência de crescimento / (+) pouco crescimento com pequena turvação e fragmentos de micélio partindo do inóculo ou soltos no meio / (++) moderado crescimento com surgimento de "pellet" fino na superfície ou ao fundo, aderido ou não no inóculo / (+++) ótimo crescimento de massa micelial da metade à todo o frasco (adaptado da ASTM Standards G21-90, 1990).

A Tabela 18 ilustra que a linhagem 1040 apresentou crescimento ótimo (+++) a partir do 6º dia de cultivo; e FUS, a partir do 12º dia de cultivo.

As linhagens apresentaram crescimentos mais relevantes neste HAP em relação aos demais HAPs com menores massas molares e de mesma concentração (criseno e perileno) utilizados como fonte de carbono em condição microaeróbia e anteriormente analisados, apesar de algumas linhagens não apresentarem crescimentos logo no 3º dia de cultivo. Este fato pode ser explicado, talvez, pela capacidade das linhagens de atuarem mais especificamente na molécula de HAPs com maiores massas molares através de outras enzimas ativadas nesta condição microaeróbia ou ainda pelo fato do naftol[2,3-a]pireno estar menos disponível diretamente à célula fúngica pelo fato de ser menos solúvel ao meio, diminuindo uma suposta inibição de crescimento nesta fonte de carbono por ocasião de efeito tóxico (McNALLY *et al.*, 1999).

Os valores de pH apresentaram-se mais baixos (2,9-4,5) em relação ao valor de pH do controle (5,5-6,0), na medida em que as linhagens apresentavam crescimentos. Estes valores de pH sugerem ativação das enzimas ligninolíticas (discutidas para o meio contendo criseno) por serem ativadas neste faixa de pH.

Não houve alteração de coloração dos meios durante o período de crescimento das linhagens.

5. 1. 5. 2. Atividades de enzimas ligninolíticas em naftol [2,3-a] pireno

➤ Lignina – peroxidase

Observa-se na Tabela 19 que a linhagem 20 apresentou maiores valores de LiP em relação às demais linhagens, com exceção do 30º dia. A linhagem 582 apresentou valores maiores de LiP (7,37 U/L.min) no 30º dia de cultivo.

Não houve produção de LiP no 3º e 6º dias de cultivo, excetuando as linhagens 20 e LH5 no 6º dia.

➤ Manganês – peroxidase

Analisando-se a Tabela 19, observa-se maiores atividades de MnP no último dia de crescimento (30º dia), destacando-se a linhagem 582 (21,21 U/L.min).

Não houve atividade de MnP no 3º dia de cultivo; e no 6º dia, para a maioria delas.

Tais valores apresentados foram inferiores aos observados para perileno e superiores aos apresentados em criseno.

➤ Peroxidase

A Tabela 19 ilustra que todas as linhagens apresentaram valores crescentes durante o período de cultivo e maiores no 30º dia de cultivo.

Os valores de peroxidase apresentados para criseno e perileno foram semelhantes aos obtidos para naftol[2,3-a]pireno, durante todo o período de cultivo analisado.

➤ **Lacase**

Analisando-se a Tabela 20, observou-se que as linhagens 490 (0,32 U/L.min a partir do 24º dia) e Q10 (0,46 U/L.min no 6º dia) apresentaram valores mais altos de atividade de lacase e em quase todos os dias de incubação, sendo que a maioria das linhagens produziu atividades no 24º e 30º dias de cultivo.

As linhagens 801 e 870 (ambas 0,35 U/L.min) também apresentaram maiores atividades no 30º dia.

Os resultados de atividade de lacase em naftol[2,3-a]pireno foram semelhantes às atividades de lacases em meio contendo criseno e perileno; porém, as maiores atividades desta enzima foram encontradas em dias diferentes para cada HAP.

➤ **Tirosinase**

Observa-se na Tabela 20 que a maioria das linhagens apresentaram maior atividade de tirosinase nos últimos dias de cultivo analisados, tendo as linhagens 870, 1040 e 1051 apresentado maior atividade de tirosinase (2,51; 3,65 e 2,53 U/L.min; respectivamente) no 24º dia de cultivo.

Os resultados de produção desta enzima em meio contendo naftol[2,3-a]pireno foram superiores aos apresentados para perileno e discretamente inferiores aos observados em criseno.

Em relação às linhagens que apresentaram melhores crescimentos em naftol [2,3-a] pireno (1040 e FUS), houve relevante produção de MnP, peroxidase e tirosinase, principalmente nos últimos dias de cultivo (18º, 24º e 30º dias).

5. 1. 5. 3. Atividade de biosurfactantes

Observa-se na Tabela 16 que a maioria das linhagens apresentaram emulsão O/A em todos os dias de cultivo, exceto no 3º dia. Em relação às linhagens com melhores crescimentos em naftol[2,3-a]pireno, apenas FUS apresentou emulsão A/O.

Tabela 19 – Valores da atividade enzimática de lignina-peroxidase, manganês-peroxidase e peroxidase (U/L.min) produzidas pelas linhagens em NAFTOL [2,3-a] PIRENO 0,05% (m/v), sob condição microaeróbia.

LiP (U/L.min)										MnP (U/L.min)									
linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	30 dias
480	ND	ND	ND	ND	0,39	0,02	ND	ND	ND	ND	ND	0,45	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,45
490	ND	ND	ND	ND	0,02	0,03	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
582	ND	ND	ND	ND	ND	7,37	ND	ND	ND	ND	ND	21,21	ND	ND	1,30	ND	ND	ND	21,21
710	ND	ND	0,07	ND	ND	0,07	ND	ND	ND	ND	ND	1,75	ND	ND	2,15	ND	ND	ND	1,75
756	ND	ND	ND	ND	ND	0,19	ND	ND	ND	ND	ND	8,12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8,12
801	ND	ND	0,34	0,05	0,13	0,06	ND	ND	ND	ND	ND	11,79	ND	ND	ND	ND	ND	ND	11,79
837	ND	ND	0,11	ND	ND	0,01	ND	ND	ND	ND	1,26	8,39	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8,39
870	ND	ND	ND	0,13	0,11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5,38	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5,38
897	ND	ND	0,07	0,20	0,17	0,05	ND	ND	ND	ND	ND	1,70	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,70
984	ND	ND	ND	0,30	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,54	0,40	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,40
1039	ND	ND	0,57	ND	0,18	ND	ND	ND	ND	ND	1,08	10,13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10,13
1040	ND	ND	0,11	ND	0,09	0,44	ND	ND	ND	ND	ND	5,20	ND	ND	ND	ND	2,74	ND	5,20
1051	ND	ND	0,11	ND	ND	0,19	ND	ND	ND	ND	ND	10,27	ND	ND	ND	ND	0,18	ND	10,27
20	ND	2,88	9,26	2,80	0,49	0,03	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
FUS	ND	ND	0,10	0,06	ND	0,11	ND	ND	ND	ND	0,67	2,78	ND	ND	ND	ND	3,18	ND	2,78
H2	ND	ND	ND	ND	ND	0,13	ND	ND	ND	ND	ND	0,99	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,99
LH5	ND	0,23	0,31	0,28	0,21	ND	ND	ND	ND	ND	0,20	1,52	ND	ND	2,57	0,20	1,26	ND	1,52
LD	ND	ND	0,25	ND	0,13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,86	ND	ND	ND	ND
Q10	ND	ND	0,17	0,23	0,24	0,23	ND	ND	ND	ND	2,69	9,52	ND	ND	2,56	2,69	4,23	ND	9,52

Peroxidase (U/L.min)										linhagens									
linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	30 dias
480	ND	ND	ND	0,02	ND	0,45	1039	ND	ND	0,17	ND	0,50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,50
490	ND	ND	0,07	0,17	0,09	0,71	1040	ND	ND	ND	0,14	0,57	ND	ND	ND	0,14	0,09	0,09	0,57
582	ND	ND	ND	ND	ND	0,70	1051	ND	ND	0,23	0,35	0,50	ND	ND	ND	0,35	0,09	0,09	0,50
710	ND	ND	0,09	0,11	0,26	0,60	20	ND	0,04	0,17	0,20	0,75	ND	ND	0,17	0,20	0,17	0,17	0,75
756	ND	ND	0,14	ND	0,26	0,63	FUS	ND	ND	ND	0,24	0,79	ND	ND	ND	0,24	0,20	0,20	0,79
801	ND	0,02	ND	ND	ND	0,60	H2	ND	ND	0,34	0,42	0,89	ND	ND	ND	0,42	0,20	0,20	0,89
837	ND	0,02	0,17	0,05	ND	0,67	LH5	ND	0,13	0,06	0,21	0,68	ND	ND	0,06	0,21	0,29	0,29	0,68
870	ND	ND	0,27	0,28	0,03	0,47	LD	ND	ND	0,17	0,37	0,86	ND	ND	0,17	0,37	0,14	0,14	0,86
897	ND	0,14	0,24	ND	0,50	0,83	Q10	ND	ND	0,16	0,25	0,93	ND	ND	ND	0,25	0,59	0,59	0,93
984	0,05	0,14	0,21	0,10	0,22	0,41	ND – Atividade não-detectada												

Tabela 20 – Valores de atividade enzimática das fenoloxidasas lacase e tirosinase (U/L.min) produzidas pelas linhagens em NAFTOL [2,3-a] PIRENO 0,05% (m/v), sob condição microaeróbia.

	Lacase (U/L.min)						Tirosinase (U/L.min)					
linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias
480	ND	0,06	ND	ND	0,03	0,24	ND	ND	0,02	0,04	0,21	2,03
490	ND	0,26	ND	0,29	0,32	0,32	ND	0,02	ND	0,22	ND	0,98
582	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,32	0,20	ND	ND	0,24
710	ND	ND	ND	0,01	0,23	ND	ND	0,32	ND	ND	0,15	0,26
756	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,04	0,01	ND	0,25
801	ND	ND	ND	0,02	ND	0,35	ND	ND	ND	ND	ND	0,47
837	ND	ND	ND	ND	0,01	0,08	ND	ND	0,12	ND	0,02	0,21
870	ND	ND	ND	0,02	0,10	0,35	ND	0,18	ND	0,31	2,51	0,16
897	ND	ND	0,04	ND	ND	0,07	ND	0,02	0,09	0,03	ND	0,39
984	ND	ND	ND	ND	0,19	ND	ND	0,05	0,20	0,38	ND	0,10
1039	ND	ND	ND	0,01	ND	0,12	ND	0,08	0,04	0,12	0,55	0,14
1040	ND	ND	ND	ND	ND	0,13	ND	0,01	ND	0,57	3,65	0,12
1051	ND	0,08	ND	0,04	0,10	ND	ND	0,01	ND	0,01	2,53	0,12
20	ND	0,25	ND	ND	ND	0,14	ND	0,08	ND	ND	ND	ND
FUS	ND	ND	ND	ND	0,01	0,04	ND	0,03	0,19	0,04	0,70	0,06
H2	ND	ND	ND	0,03	0,17	ND	ND	ND	0,27	0,08	0,11	0,18
LH5	ND	ND	ND	ND	ND	0,10	ND	0,04	0,16	0,09	0,05	0,04
LD	ND	ND	ND	ND	0,09	0,20	ND	0,05	0,16	0,14	0,29	0,22
Q10	0,21	0,46	0,3500	ND	0,22	0,31	0,06	0,18	ND	0,25	0,23	0,20

ND - Atividade não-detectada

Tabela 21 – Emulsões óleo em água (Abs.) e água em óleo (Halo) produzidas pelas linhagens crescidas em naftol [2,3-a] pireno 0,05%, sob microaerobiose.

Linhagens	3 dias		6 dias		12 dias		18 dias		24 dias		30 dias	
	Abs. ¹	Halo ²	Abs.	Halo	Abs.	Halo	Abs.	Halo	Abs.	Halo	Abs.	Halo
480	ND	ND	0,18	ND	0,04	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	ND
490	ND	ND	0,02	ND	0,01	ND	0,10	ND	0,05	ND	0,01	0,20
582	ND	ND	0,03	ND	0,03	ND	0,15	0,80	ND	1,00	0,05	0,20
710	ND	ND	0,06	ND	0,01	ND	0,05	ND	0,03	ND	0,04	ND
756	ND	ND	0,06	ND	0,14	ND	0,10	ND	ND	ND	ND	ND
801	ND	ND	0,01	ND	ND	ND	ND	ND	0,04	ND	ND	ND
837	ND	ND	ND	ND	0,08	ND	0,07	ND	ND	ND	ND	ND
870	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,03	ND	0,02	ND	ND	ND
897	ND	ND	0,35	0,30	0,18	0,30	0,17	ND	ND	ND	0,25	ND
984	ND	ND	0,02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,03	0,20
1039	ND	ND	0,21	ND	0,05	ND	0,01	ND	0,05	ND	0,01	ND
1040	ND	ND	0,07	ND	0,04	ND	0,02	ND	0,045	ND	0,08	ND
1051	ND	ND	0,07	ND	0,15	ND	0,10	0,40	0,18	ND	0,17	ND
20	ND	ND	0,08	ND	0,12	ND	0,01	0,50	0,01	ND	0,03	2,00
FUS	ND	ND	ND	0,60	0,20	0,60	0,05	0,80	0,10	1,00	0,15	0,30
H2	ND	ND	0,07	ND	0,08	ND	0,07	1,00	0,14	ND	0,07	ND
LH5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,035	0,50	0,02	0,70	0,13	0,30
LD	ND	ND	0,03	0,70	0,16	0,70	0,02	1,5	0,04	1,00	0,04	1,20
Q10	ND	ND	0,03	ND	0,05	ND	0,02	ND	ND	ND	0,03	0,20

ND - NÃO DETECTADO

1 - Absorbância lida a 610 nm

2 - Tamanho do halo em centímetros

5. 1. 6. Decaciclono

5. 1. 6. 1. Crescimento das linhagens em decaciclono

As linhagens apresentaram crescimentos em decaciclono 0,05% (m/v) de acordo com a Tabela 22.

Tabela 22 – Crescimento das linhagens em **decaciclono** 0,05 % (m/v) sob condição microaeróbia

Linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	pH final
480	-	-	+	+	+	+	4,00
490	-	-	+	+	+	+	3,90
582	-	-	+	+	+	+	4,50
710	+	+	++	+++	+++	+++	4,60
756	+	+	+	+	++	++	4,20
801	+	+	++	++	++	++	4,10
837	+	+	+	+	+	+	4,20
870	+	+	+	+	+	++	3,80
897	+	+	+	+	+	+	3,80
984	-	+	+	+	+	+	3,80
1039	+	+	+	+	+	+	5,50
1040	+	++	++	++	+++	+++	3,00
1051	+	+	+	+	+	+	3,70
20	-	+	+	+	+	+	4,70
FUS	+	+	+	+	+	++	5,00
H2	+	+	+	+	+	++	4,70
LH5	+	+	+	++	++	++	5,30
LD	+	+	+	+	+	+	5,50
Q10	+	++	++	+++	+++	+++	2,90

(-) ausência de crescimento / (+) pouco crescimento com pequena turvação e fragmentos de micélio partindo do inóculo ou soltos no meio / (++) moderado crescimento com surgimento de "pellet" fino na superfície ou ao fundo, aderido ou não no inóculo / (+++) ótimo crescimento de massa micelial da metade à todo o frasco (adaptado da ASTM Standards G21-90, 1990).

A Tabela 22 ilustra que as linhagens 710 e Q10 apresentaram crescimentos ótimos (+++) a partir do 18º dia até o 30º dia de cultivo; e a linhagem 1040, a partir do 24º dia de cultivo.

Em relação aos demais HAPs, as linhagens crescidas em meio contendo decaciclino apresentaram níveis de crescimento semelhantes aos obtidos em meio contendo perileno (5 anéis) como fonte de carbono e menores em relação aos meios contendo criseno e naftol [2,3-a] pireno (4 e 6 anéis, respectivamente). Comparando-se o crescimento dos fungos em meio contendo os HAPs de 4 a 10 anéis aromáticos, não foi verificado a relação de quanto menor o número de anéis aromáticos, maior o crescimento por existir uma maior disponibilidade da molécula à biodegradação (BLACK, 1983; CERNIGLIA & HETKAMP, 1989). Os melhores crescimentos foram verificados em naftol [2,3-a] pireno, criseno, decaciclino e perileno, todos na concentração 0,05% (m/v).

Os valores de pH dos meios de cultivo apresentaram-se na faixa de 3,0-5,5 durante todo o período de crescimento, o que pode propiciar para a maioria das linhagens a ativação das enzimas ligninolíticas, como discutido para as fontes de carbono anteriores.

Não houve mudança de coloração dos meios de cultura com inóculos durante o período de cultivo, apresentando certo clareamento dos meios na medida em que as linhagens apresentavam crescimentos. Fato este ocorrido, provavelmente, pela solubilização do HAP no meio de cultivo por algum mecanismo do fungo (por exemplo, produção de biosurfactantes) para disponibilizá-lo à degradação.

5. 1. 6. 2. Atividades de enzimas ligninolíticas em decaciclono

➤ Lignina – peroxidase

Observa-se na Tabela 23 que a maioria das linhagens apresentou valores maiores de atividade de LiP no 24º dia de cultivo. A linhagem 870 mostrou maior atividade no 3º dia de cultivo (2,19 U/L.min), sendo que a linhagem Q10 apresentou valores crescentes de LiP no decorrer dos dias analisados.

Os resultados de LiP apresentados pelas linhagens para decaciclono foram superiores aos observados para criseno (4 anéis) e perileno (5 anéis); semelhantes aos apresentados para naftol [2,3-a] pireno (6 anéis).

➤ Manganês – peroxidase

Analisando-se a Tabela 23, observa-se que a maioria das linhagens apresentou atividades maiores no último dia de crescimento (30º dia), destacando-se as linhagens 20 (9,73 U/L.min), FUS (10,85 U/L.min), H2 (8,61 U/L.min), LH5 (8,56 U/L.min) e Q10 (10,26 U/L.min).

Os resultados observados para MnP em decaciclono foram inferiores aos apresentados por perileno e naftol[2,3-a]pireno.

➤ Peroxidase

As linhagens apresentaram aumento de atividade enzimática de peroxidase no decorrer dos dias de crescimento, chegando em maiores valores no 30º dia. Estes resultados apresentados foram superiores aos analisados para criseno e perileno e semelhantes aos determinados para naftol [2,3-a] pireno.

➤ **Lacase**

Na Tabela 24, observa-se que as atividades de lacase foram crescentes no decorrer dos dias de cultivo, destacando melhores resultados no 30º dia de cultivo para todas as linhagens.

Os resultados apresentados nesta análise foram superiores aos observados em criseno (4 anéis), perileno (5 anéis), naftol[2,3-a]pireno (6 anéis).

➤ **Tirosinase**

De acordo com a Tabela 24, foi verificada atividade de tirosinase para quase todas as linhagens no 12º dia de cultivo. A linhagem H2 apresentou um valor máximo de tirosinase (1,41 U/L.min) no 6º dia de cultivo em meio contendo decaciclono.

Os resultados de tirosinase apresentados para esta fonte de carbono foram inferiores a criseno e naftol[2,3-a]pireno; sendo semelhantes aos obtidos para perileno .

As linhagens que apresentaram melhores crescimentos em decaciclono (710, 1040 e Q10) foram capazes de produzir consideráveis atividades de LiP e MnP. Dentre as linhagens que apresentaram melhores crescimentos nesta fonte de carbono, apenas Q10 obteve resultados relevantes para todas as enzimas analisadas, bem como a linhagem 710 para peroxidase e lacase.

5.1.6.3. Atividade de biosurfactantes

Analisando-se a Tabela 25, a maioria das linhagens apresentou emulsão O/A para todos os dias de cultivo. Em relação aos melhores crescimentos em decaciclono, apenas Q10 apresentou emulsão A/O.

Tabela 23 – Valores da atividade enzimática de lignina-peroxidase, manganês-peroxidase e peroxidase (U/L.min) produzidas pelas linhagens em DECACICLENO 0,05% (m/v), sob microaeróbia.

linhagens	LiP (U/L.min)						MnP (U/L.min)					
	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias
480	ND	ND	ND	0,01	0,16	0,23	ND	ND	ND	ND	ND	5,29
490	ND	ND	ND	ND	ND	0,10	ND	ND	ND	ND	1,21	2,60
582	ND	ND	ND	0,04	0,07	0,22	3,27	ND	ND	ND	ND	ND
710	0,43	ND	ND	0,24	0,20	0,22	ND	ND	ND	ND	ND	ND
756	0,12	ND	ND	0,01	0,29	0,04	ND	ND	ND	1,17	ND	1,08
801	0,16	ND	ND	ND	0,02	0,12	ND	ND	ND	ND	ND	0,22
837	ND	ND	ND	0,18	0,24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
870	2,19	ND	0,04	0,15	1,59	0,02	ND	ND	ND	ND	2,91	0,31
897	1,08	ND	ND	0,11	ND	0,13	ND	ND	ND	ND	0,54	0,58
984	ND	ND	ND	0,28	ND	0,06	ND	ND	ND	5,78	0,13	1,39
1039	0,45	0,06	ND	0,14	1,14	0,06	ND	ND	ND	5,02	ND	4,44
1040	0,04	ND	ND	0,40	0,56	0,02	ND	ND	4,44	0,90	5,25	0,40
1051	0,11	0,08	ND	0,10	0,32	0,10	ND	ND	ND	3,36	ND	4,80
20	ND	ND	0,14	0,10	0,46	0,04	ND	ND	ND	0,13	ND	9,73
FUS	ND	0,64	ND	0,46	0,39	0,05	ND	0,13	ND	3,45	ND	10,85
H2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8,61
LH5	ND	0,03	ND	0,19	1,82	0,22	ND	ND	ND	3,50	ND	8,56
LD	ND	ND	ND	ND	1,77	0,04	ND	ND	ND	ND	0,31	6,05
Q10	ND	0,14	0,19	0,35	0,85	1,56	ND	0,16	0,56	4,25	3,26	10,26

linhagens	Peroxidase (U/L.min)						linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias
	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias		3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias
480	ND	ND	ND	ND	ND	0,23	1039	0,12	0,28	0,28	ND	0,22	0,06
490	ND	ND	ND	ND	0,30	0,10	1040	0,09	0,05	0,22	ND	0,25	0,02
582	ND	ND	ND	ND	0,11	0,22	1051	0,01	0,21	0,55	ND	0,24	0,10
710	0,17	0,15	0,03	ND	ND	0,22	20	ND	0,33	0,11	ND	0,33	0,045
756	ND	0,15	0,26	ND	0,33	0,04	FUS	0,19	0,23	0,35	ND	0,40	0,05
801	0,02	0,05	0,38	ND	0,19	0,12	H2	ND	0,41	0,41	ND	0,32	ND
837	ND	0,25	ND	ND	0,22	ND	LH5	0,14	0,30	0,22	ND	0,20	0,22
870	ND	0,29	ND	ND	0,17	0,02	LD	0,43	0,22	0,31	ND	0,18	0,04
897	ND	0,30	0,23	ND	0,32	0,13	Q10	0,26	0,36	0,30	0,39	0,49	1,56
984	ND	0,24	0,38	ND	0,15	0,06	ND – Atividade não detectada						

Tabela 24 – Valores de atividade enzimática das fenoloxidasases lacase e tirosinase (U/L.min) produzidas pelas linhagens em DECACICLENO 0,05% (m/v), sob condição microaeróbia.

linhagens	Lacase (U/L.min)						Tirosinase (U/L.min)					
	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias
480	ND	ND	ND	ND	0,26	0,72	ND	ND	0,25	ND	ND	ND
490	ND	ND	ND	ND	0,23	0,69	ND	ND	ND	ND	ND	ND
582	ND	ND	ND	ND	0,16	0,60	ND	ND	0,10	ND	ND	ND
710	0,13	0,09	ND	ND	0,28	0,51	ND	0,18	0,04	ND	ND	ND
756	0,09	0,20	0,05	ND	0,35	0,70	ND	ND	ND	ND	ND	ND
801	0,04	0,04	0,29	ND	0,27	0,60	ND	ND	ND	ND	ND	ND
837	ND	0,19	ND	ND	0,40	0,53	0,27	ND	0,04	ND	ND	ND
870	0,04	0,31	ND	ND	0,30	0,56	ND	ND	0,05	ND	ND	ND
897	0,16	0,21	ND	0,03	0,31	0,62	ND	ND	0,08	0,76	ND	ND
984	ND	0,18	ND	0,07	0,20	0,47	ND	ND	0,08	0,14	ND	ND
1039	0,18	0,10	0,19	ND	0,20	0,68	ND	ND	0,18	0,50	ND	ND
1040	ND	ND	ND	ND	0,18	0,54	ND	ND	0,14	ND	ND	ND
1051	ND	ND	0,16	ND	0,20	0,68	ND	ND	0,37	ND	ND	ND
20	ND	0,15	ND	ND	0,35	0,57	ND	0,01	0,16	ND	ND	ND
FUS	0,20	0,02	0,20	ND	0,35	0,57	ND	ND	0,08	0,44	0,26	ND
H2	0,20	0,14	0,36	0,07	0,41	0,55	ND	1,41	0,15	ND	ND	ND
LH5	0,51	0,14	0,06	ND	0,37	0,63	ND	ND	0,04	ND	ND	ND
LD	ND	ND	0,23	ND	0,04	0,68	ND	ND	0,06	ND	ND	ND
Q10	ND	0,14	0,30	0,20	0,32	0,70	ND	0,24	0,21	0,30	0,25	ND

ND- Atividade não-detectada

Tabela 25 – Emulsões óleo em água (Abs.) e água em óleo (Halo) produzidas pelas linhagens crescidas em decaciclono 0,05%, sob condição micraoeróbia.

Linhagens	3 dias		6 dias		12 dias		18 dias		24 dias		30 Dias	
	Abs. ¹	Halo ²	Abs.	Halo	Abs.	Halo	Abs.	Halo	Abs.	Halo	Abs.	Halo
480	0,04	ND	0,05	ND	0,03	ND	0,01	ND	ND	ND	0,16	ND
490	0,04	ND	0,03	ND	0,03	ND	0,05	ND	ND	0,50	ND	0,20
582	0,01	ND	ND	ND	ND	ND	0,06	ND	ND	ND	ND	ND
710	0,07	0,20	0,03	ND	0,05	ND	0,13	ND	0,07	ND	ND	ND
756	0,02	ND	ND	ND	0,03	ND	0,04	ND	0,06	0,30	0,1	0,30
801	0,05	ND	ND	ND	0,02	ND	0,03	ND	ND	ND	0,01	ND
837	0,03	0,10	0,01	0,70	0,03	ND	0,08	ND	ND	0,20	ND	0,30
870	0,11	0,10	0,01	ND	0,01	ND	0,02	ND	0,02	ND	0,01	ND
897	0,03	ND	0,05	ND	0,01	ND	0,04	ND	ND	0,20	ND	ND
984	0,02	1,20	ND	1,60	ND	1,30	0,04	1,00	ND	1,20	ND	1,30
1039	0,08	ND	0,16	ND	0,05	ND	0,05	ND	ND	ND	0,04	ND
1040	0,15	ND	0,01	ND	0,03	ND	0,17	ND	0,02	ND	0,12	ND
1051	ND	ND	0,05	ND	0,02	ND	0,03	ND	ND	ND	0,12	ND
20	0,03	0,20	0,03	ND	0,01	ND	0,03	ND	ND	ND	0,11	1,00
FUS	0,01	ND	0,13	ND	0,08	ND	0,03	ND	ND	ND	0,17	ND
H2	ND	ND	0,01	0,80	0,14	1,30	0,05	1,50	0,05	1,70	ND	1,80
LH5	0,05	ND	0,03	0,40	0,02	0,80	ND	1,50	0,04	1,00	ND	0,80
LD	0,02	0,10	ND	0,40	0,19	ND	0,05	ND	0,08	ND	0,07	ND
Q10	0,01	0,20	0,02	0,30	0,02	0,20	0,01	0,50	0,03	0,30	0,02	0,60

ND - NÃO DETECTADO

1 - Absorbância lida a 610 nm

2 - Tamanho do halo em centímetros

5.1.7. Ácido Lignosulfônico

5.1.7.1. Crescimento das linhagens em Ácido Lignosulfônico (AL)

Os crescimentos das linhagens em ácido lignosulfônico 0,2% (m/v) foram visualizados de acordo com a Tabela 26.

Tabela 26 – Crescimento das linhagens em ácido lignosulfônico 0,2% (m/v) sob condição microaeróbia

Linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	pH final
480	+	+	+	+	+	+	6,20
490	+	+	+	+	+	+	4,50
582	+	+	+	+	+	+	6,40
710	+	++	++	+++	+++	+++	6,00
756	+	+	++	++	+++	+++	5,93
801	+	++	+++	++	++	+	6,45
837	+	+	+	+	+	+	4,30
870	+	++	++	++	++	+++	6,05
897	+	++	++	++	++	++	3,90
984	+	+	+	++	++	++	5,06
1039	++	++	++	+++	+++	+++	5,20
1040	++	++	+++	+++	+++	+++	4,00
1051	+	++	++	+++	+++	+++	5,50
20	+	+	++	++	+++	+++	5,60
FUS	+	+	++	++	++	++	6,10
H2	+	++	+++	+++	+++	+++	6,45
LH5	+	++	++	++	++	+++	5,90
LD	+	++	++	+++	+++	+++	6,70
Q10	-	-	+	++	++	++	4,00

(-) ausência de crescimento / (+) pouco crescimento com pequena turvação e fragmentos de micélio partindo do inóculo ou soltos no meio / (++) moderado crescimento com surgimento de "pellet" fino na superfície ou ao fundo, aderido ou não no inóculo / (+++) ótimo crescimento de massa micelial da metade à todo o frasco (adaptado da ASTM Standards G21-90, 1990).

As linhagens 801, 1040 e H2, de acordo com a Tabela 26, apresentaram ótimos crescimentos a partir do 12º dia de cultivo. A linhagem 801, após o 18º dia, apresentou uma “diminuição” de crescimento e dissolução micelial, devido talvez a uma toxicidade do meio por produtos de seu metabolismo celular ou da biotransformação do AL sob esta condição microaeróbia.

As linhagens apresentaram alterações em $\pm 0,5$ do pH inicial (5,5-6,0). Apenas as linhagens 837, 893 e 1040 apresentaram valores de pH mais ácidos: 4,3; 3,9 e 4,0; respectivamente, ao final do período de experimento, provavelmente pela produção de ácidos pelo metabolismo de fermentação de compostos lignocelulósicos por fungos (PAVARINA & DURRANT, 2001).

As linhagens 870, 984, 20, e H2 apresentaram mudança de coloração de amarelo (cor inicial do meio contendo AL) para marrom no 3º dia de incubação, permanecendo assim até o 30º dia. A mudança de cor pode estar relacionada a algum produto de degradação do AL por estas linhagens ou reação de algum metabólito produzido com o meio de cultivo.

5.1.7.2. Atividades das enzimas ligninolíticas em ácido lignosulfônico

➤ Lignina – peroxidase

Analisando-se a Tabela 27, notou-se maior produção de LiP pela linhagem 1040 no 30º dia (18,11 U/L.min). As linhagens 20 e 1039 apresentaram picos máximos de LiP no 6º dias (18,92 e 17,20 U/L.min respectivamente); a linhagem H2, no 12º dia (15,02 U/L.min) e a LH5, no 18º dia (12,31 U/L.min). Todas as linhagens aqui discutidas apresentaram crescimentos ótimos no decorrer do período de cultivo.

No final do período de cultivo (30 dias), a maioria das linhagens já não apresentaram mais atividade de LiP, provavelmente, pelo fato desta enzima ter sido produzida e ativada anteriormente e ter sido reabsorvida pelo fungo após seu período de atuação por não ser mais necessária ao sistema de degradação.

FALCONI (1998) verificou a produção de 2,5 - 4,2 U/L.min de LiP por fungos ligninolíticos cultivados em ácido lignosulfônico 0,01% por 3 a 10 dias sob condição estacionária aeróbia. PAVARINA *et al.* (1999) relataram a produção de LiP (máximo de 0,5 U/L.min) por fungos microaeróbios cultivados em meio contendo 0,5% de material lignocelulósico por 20 e 35 dias. Tais atividades foram inferiores às obtidas neste presente trabalho.

SETTE (1997) obteve valores de LiP produzida por fungos em ácido lignosulfônico 0,5% em condição microaeróbia (20 e 35 dias de cultivo) semelhantes aos apresentados pelas linhagens com melhores atividades descritas anteriormente.

➤ Manganês – peroxidase

A Tabela 27 ilustra que, de um modo geral, houve uma diminuição de atividade de MnP no decorrer dos dias de cultivo. A linhagem 20 apresentou uma máxima atividade no 24º dia (27,8 U/L.min). No 30º dia de cultivo, não foi detectada atividade de MnP, exceto para as linhagens 490 e 837.

Fungos crescidos em ácido lignosulfônico 0,05% em condição estacionária aeróbia apresentou valores de MnP de até 4,8 U/L.min (FALCONI, 1998). PAVARINA e colaboradores (1999) relataram atividades de MnP de até 5 U/L.min produzidas por fungos microaeróbios crescidos em material lignocelulósico (0,5%), valores estes inferiores aos apresentados no presente trabalho.

➤ **Peroxidase**

Todas as linhagens produziram peroxidase em meio contendo ácido lignosulfônico. Foi detectado atividade da enzima em quase todos os dias de cultivo. O maior valor de atividade de peroxidase foi apresentado pela linhagem 20 (5,34U/L.min) no 6º dia de crescimento. A maioria das linhagens apresentou atividades destas enzimas semelhantes aos resultados obtidos por PAVARINA *et al.* (1999), com valores entre 0,2 e 1,2 U/L.min, em sistema microaeróbio de 20 e 35 dias. Fungos crescidos em ácido lignosulfônico 0,05% em sistema estacionário de 3 a 10 dias (FALCONI, 1998) apresentaram atividade de peroxidases máxima de 1,0 U/L.min. Apesar deste resultado ser semelhante aos verificados neste presente trabalho, a concentração utilizada é muito menor, não se encontrando em experimento de microaerobiose.

➤ **Lacase**

De acordo com a Tabela 27, a linhagem 20 apresentou maiores valores de atividade de lacase no 6º, 12º e 18º dias de cultivo (3,44; 3,84 e 4,18 U/L.min - respectivamente). Ao final de 30 dias, todas as linhagens ainda apresentaram alguma atividade desta enzima.

SETTE (1997) apresentou atividade máxima de 0,5 U/L.min de lacase por fungos crescidos em ácido lignosulfônico 0,5% sob condição microaeróbia em 20 e 35 dias de cultivo. Atividades máximas de 1,0 U/L.min foram verificadas por FALCONI (1998), em cultura estacionária e utilizando ácido lignosulfônico 0,01% (m/v) de 3 a 10 dias. Máximas atividades de 0,5 U/L.min de lacase foram obtidas por PAVARINA *et al.* (1999) cultivando fungos microaeróbios em 20 e 35 dias, com material lignocelulósico 0,5%. A maioria das linhagens apresentou atividades semelhantes aos verificados neste presente trabalho.

Tabela 27 – Valores da atividade enzimática de lignina-peroxidase, manganês-peroxidase, peroxidase e lacase (U/L.min) produzidas pelas linhagens em ácido lignossulfônico 0,2%(m/v), sob microaerobiose.

	LIP (U/L.min)						MnP (U/L.min)					
linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias
480	0,30	ND	ND	0,60	0,15	ND	11,48	4,89	3,00	ND	ND	ND
490	3,45	ND	ND	ND	ND	ND	5,47	4,22	ND	3,68	3,23	4,39
582	7,11	0,78	3,08	9,87	2,04	ND	9,10	7,44	ND	ND	ND	ND
710	0,25	ND	ND	2,00	5,05	7,54	0,31	6,01	ND	0,54	0,04	ND
756	1,58	5,84	ND	1,78	1,77	ND	0,94	5,20	3,77	1,03	ND	ND
801	ND	6,63	8,96	ND	ND	ND	0,40	2,42	6,46	1,48	ND	ND
837	0,77	2,69	ND	2,10	12,00	ND	1,57	3,14	ND	3,45	2,11	4,17
870	0,41	ND	ND	ND	3,40	ND	2,38	4,08	4,71	ND	ND	ND
897	5,13	ND	ND	ND	8,43	ND	1,52	10,04	2,60	2,87	ND	ND
984	8,95	2,45	1,16	0,29	0,05	ND	ND	4,89	5,61	2,47	0,58	ND
1039	1,58	17,20	ND	8,13	ND	ND	ND	6,32	3,86	ND	ND	ND
1040	5,16	7,07	12,59	7,98	ND	18,12	6,50	6,41	4,71	4,04	0,21	ND
1051	ND	0,52	ND	10,50	ND	ND	11,25	5,78	5,39	3,27	ND	ND
20	0,20	18,92	ND	ND	8,93	0,70	5,07	7,44	3,77	ND	27,80	ND
FUS	ND	ND	ND	ND	6,98	ND	13,32	7,35	5,02	1,79	0,45	ND
H2	ND	3,70	15,03	2,11	ND	ND	6,50	3,23	4,89	1,70	2,82	ND
LH5	ND	ND	ND	12,31	ND	4,84	9,33	6,28	ND	1,88	ND	ND
LD	0,65	3,56	ND	3,13	5,87	7,07	5,65	5,43	ND	ND	ND	ND
Q10	1,26	4,24	3,66	7,27	8,36	10,17	7,33	8,30	3,59	1,99	1,27	ND

	Peroxidase (U/L.min)						Lacase (U/L.min)					
linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias
480	0,38	ND	0,24	0,31	ND	0,24	0,18	0,02	0,15	0,26	0,05	0,70
490	0,07	0,02	0,86	0,33	ND	0,06	0,31	ND	1,03	0,41	0,22	0,12
582	0,04	ND	0,05	0,69	0,45	0,07	0,04	0,03	0,04	0,44	0,57	0,14
710	0,27	0,08	0,19	0,20	0,51	0,07	0,16	0,05	0,06	0,57	0,46	0,31
756	0,10	ND	0,39	0,70	0,06	0,02	0,32	0,04	0,02	0,90	0,36	0,27
801	0,23	ND	0,75	0,24	0,13	0,01	0,11	0,06	0,12	0,66	0,40	0,28
837	0,25	ND	ND	0,08	ND	0,17	0,27	ND	ND	1,22	0,23	0,46
870	0,69	0,13	0,22	0,54	ND	0,42	0,50	0,07	0,15	0,10	0,21	ND
897	0,11	ND	0,24	ND	ND	ND	0,33	ND	ND	0,46	0,26	0,28
984	0,24	ND	0,19	ND	0,11	ND	0,39	ND	ND	0,48	0,21	0,61
1039	0,33	0,03	0,34	0,35	ND	0,23	0,88	0,09	0,10	0,93	0,22	0,34
1040	0,21	ND	0,27	0,27	0,26	ND	0,57	0,01	0,81	0,52	0,26	ND
1051	0,59	0,01	0,45	0,19	0,26	0,09	1,08	0,06	0,12	0,98	0,58	0,17
20	1,66	5,34	1,15	2,09	0,01	0,18	1,31	3,44	3,84	4,18	0,47	0,46
FUS	0,44	ND	0,10	0,48	ND	0,14	0,49	0,02	0,03	0,34	0,06	0,46
H2	0,76	0,04	0,28	0,44	ND	0,20	1,02	0,10	0,26	1,29	0,28	0,84
LH5	0,61	0,16	0,19	0,59	ND	0,15	0,85	0,10	0,13	0,30	0,12	1,11
LD	0,40	ND	0,81	0,29	0,16	0,20	0,33	0,07	0,81	0,24	ND	0,24
Q10	0,51	0,37	0,46	0,44	0,09	0,19	0,21	0,09	0,17	0,22	0,50	0,78

ND – Atividade não-detectada

5. 1. 8. Ácido Tânico

5. 1. 8. 1. Crescimento das linhagens em Ácido tânico (AT)

Os crescimentos das linhagens em ácido tânico 0,2% (m/v) foram visualizados conforme apresentado na Tabela 28.

Tabela 28 – Crescimento das linhagens em ácido tânico 0,2% (m/v) sob condição microaeróbia.

Linhagens	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	pH final
480	+	+	+	++	++	-	4,30
490	+	+	+	++	++	-	4,16
582	+	+	+	+	+	+	4,08
710	+	+	+	++	+++	+++	4,40
756	-	+	+	+	+	+	4,87
801	++	++	++	++	+++	+++	5,15
837	-	+	++	+++	+++	+++	3,00
870	+	+	+	+	+	+	4,65
897	++	++	++	+++	+++	+++	2,78
984	++	++	++	++	++	++	2,83
1039	-	+	+	+	+	+	4,10
1040	++	++	+++	+++	+++	+++	2,93
1051	-	+	++	++	++	++	3,85
20	-	+	+	+	+	+	4,25
FUS	+	+++	+++	+++	+++	+++	5,15
H2	+	+	+	+	++	++	4,60
LH5	+	+	++	+++	+++	+++	4,20
LD	+	+	+	++	++	++	4,80
Q10	-	-	+	++	++	++	4,5

(-) ausência de crescimento / (+) pouco crescimento com pequena turvação e fragmentos de micélio partindo do inóculo ou soltos no meio / (++) moderado crescimento com surgimento de "pellet" fino na superfície ou ao fundo, aderido ou não no inóculo / (+++) ótimo crescimento de massa micelial da metade à todo o frasco (adaptado da ASTM Standards G21-90, 1990).

Em relação à Tabela 28, as linhagens 480, 490, 582, 756, 1039 e 20 tiveram seus crescimentos estacionados e; as linhagens 480 e 490, a massa micelial “dissolvida” no meio líquido, provavelmente devido à toxicidade do meio no crescimento prolongado em atmosfera microaeróbia.

As linhagens 801, 897 e 1040 apresentaram moderado crescimento (++) já no 3º dia de incubação. Ótimo crescimento (+++) foi observado a partir do 6º dia para FUS, 12º dia para 1040 e no 18º dia para as linhagens 837, 897 e LH5.

Os valores de pH de todas as linhagens apresentaram-se ácidos (5,0 – 2,6) na medida em que havia aumento de crescimento, sugerindo a produção de ácidos, na ativação do sistema fermentativo das linhagens para consumo da fonte de carbono com limitação de oxigênio (PAVARINA & DURRANT, 2001). As linhagens com valores mais baixos de pH do meio de cultivo em 30 dias foram: 837 (pH 3,0), 897 (pH 2,78), 984 (pH 2,83) e 1040 (pH 2,93), todas com crescimentos ótimos (+++).

Ao final do período de incubação, os fungos 801 e H2 apresentaram alteração da coloração do meio de cultivo, de bege-róseo à marrom. A linhagem 870 alterou a coloração do meio para bege-esverdeado. A linhagem 984 alterou o meio produzindo uma cor amarelo-ouro; o fungo 1040, bege-marrom e curiosamente, a linhagem LD alterou o meio para marrom escuro.

Notou-se ainda que não houve mudança de cor do meio de cultura para as linhagens que apresentaram pouco ou nenhum crescimento.

As mudanças de coloração dos meios ocorreram, possivelmente, devido à produção de sub-produtos diferentes para cada linhagem, decorrente da utilização da fonte de carbono. Estes metabólitos poderiam ainda estar reagindo com o ácido tânico ou algum elemento do meio de cultura (sais minerais), originando tais modificações de cores.

Os crescimentos das linhagens em AT foram semelhantes aos verificados no meio contendo AL, ambos na concentração de 0,2% (m/v).

5. 1. 8. 2. Atividades de enzimas ligninolíticas em ácido tânico

➤ Lignina – peroxidase

De acordo com a Tabela 29, algumas linhagens apresentaram atividades de LiP durante todos os períodos de crescimento (837, 897, 1040 e FUS). A linhagem 801 apresentou produção máxima de atividade no 30º dia de cultivo (17,02 U/L.min).

As atividades de LiP foram crescentes para a maioria das linhagens durante o período de cultivo. Todas as linhagens acima apresentaram crescimentos ótimos até 30 dias de incubação. FALCONI (1998) obteve valores pouco inferiores de LiP produzidos por fungos cultivados em ácido tânico 0,5% em condição estacionária de 3 a 10 dias (máximo de 9,2 U/L.min). Tal resultado foi semelhante para a maioria das linhagens nos dias de cultivo analisados.

➤ Manganês – peroxidase

Observa-se na Tabela 29 que as linhagens 801, 837, 897, 1039, 1040, FUS e LH5 apresentaram valores consideráveis de atividade de MnP em todos os dias de crescimento, excetuando as linhagens 837 e 897 que não apresentaram atividades no 3º dia, bem como as linhagens 1039 e FUS, no 6º dia. As linhagens 710 e LD apresentaram atividades bastante elevadas no 18º e 24º dia de cultivo (29,85 e 29,95 U/L.min – respectivamente).

Resultados de atividades de MnP apresentados por FALCONI (1999) foi, no máximo, de 2 U/L.min por fungos cultivados em ácido tânico 0,5% em condição estacionária de 3 a 10 dias. Tais valores apresentados foram bem inferiores aos determinados neste trabalho.

➤ Peroxidase

Melhores atividades de peroxidase ocorreram a partir do 12º dia para todas as linhagens, estendendo-se até o 30º dia, onde a maioria das linhagens apresentou atividades.

➤ Lacase

Os valores de lacase apresentados na Tabela 29, são crescentes para quase todas as linhagens e suas atividades foram semelhantes, de uma maneira geral, aos resultados de peroxidase.

Tabela 29 – Valores da atividade enzimática de lignina-peroxidase, manganês-peroxidase, peroxidase e lacase (U/L.min) produzidas pelas linhagens em ácido tânico 0,2% (m/v), sob condição microaeróbia.

linhagens	LiP (U/L.min)					MnP (U/L.min)						
	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias
480	ND	ND	ND	1,57	4,60	ND	ND	ND	2,19	17,76	20,54	ND
490	ND	0,82	11,39	ND	ND	ND	ND	ND	5,65	26,45	7,35	ND
582	ND	0,41	1,24	0,54	1,54	3,32	ND	ND	ND	ND	ND	ND
710	ND	ND	ND	4,48	5,24	4,95	ND	ND	ND	29,86	25,02	ND
756	1,03	0,79	ND	5,32	8,13	9,51	ND	ND	ND	ND	ND	ND
801	ND	0,14	0,88	7,74	11,40	17,02	9,37	15,74	15,47	ND	18,12	19,77
837	5,40	8,54	11,53	1,52	5,21	6,00	ND	16,64	22,24	16,99	17,94	14,98
870	ND	ND	0,60	0,08	ND	0,08	ND	ND	ND	ND	25,78	ND
897	0,02	3,57	5,24	6,25	5,63	11,47	ND	18,74	9,60	18,02	19,24	ND
984	ND	0,01	0,03	ND	ND	0,20	ND	18,03	9,37	19,28	18,79	ND
1039	ND	ND	ND	1,63	ND	5,39	3,59	ND	7,31	ND	ND	ND
1040	0,21	5,76	7,91	6,27	10,20	15,01	16,59	7,62	28,25	20,99	16,50	13,54
1051	ND	ND	0,83	ND	ND	ND	ND	5,38	ND	ND	ND	ND
20	ND	ND	4,35	7,43	6,52	5,85	ND	ND	ND	ND	ND	ND
FUS	3,00	5,24	7,35	4,22	6,32	12,55	3,68	ND	3,05	19,01	ND	ND
H2	ND	ND	0,12	ND	4,12	7,57	ND	ND	21,84	ND	18,65	ND
LH5	ND	0,03	0,73	ND	ND	ND	3,90	7,31	13,03	20,18	19,51	19,82
LD	ND	ND	ND	3,82	9,17	9,23	ND	ND	ND	8,07	29,95	ND
Q10	ND	ND	0,05	2,30	5,32	10,23	2,15	3,02	3,25	8,25	9,22	12,90

linhagens	Peroxidase (U/L.min)					Lacase (U/L.min)						
	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias	3 dias	6 dias	12 dias	18 dias	24 dias	30 dias
480	0,31	0,18	0,32	1,12	0,87	0,98	0,89	0,13	0,06	1,32	0,84	0,16
490	ND	0,00	0,59	1,03	0,64	0,32	0,38	0,04	0,28	0,99	0,58	0,72
582	0,13	0,01	0,30	0,34	0,37	0,43	0,30	0,13	0,09	0,58	0,34	0,06
710	ND	0,07	0,48	1,45	1,02	0,70	0,15	0,05	0,13	1,17	1,02	0,85
756	ND	0,08	0,56	0,55	0,29	0,63	0,42	0,04	0,14	0,48	0,13	0,32
801	0,33	0,28	1,15	0,80	1,04	1,26	0,55	0,30	0,97	0,42	0,92	1,56
837	0,18	0,51	1,30	1,23	1,29	1,20	0,40	0,59	1,21	1,51	1,00	1,74
870	0,30	0,21	0,57	0,68	0,43	0,50	0,36	0,03	0,37	1,00	1,01	0,87
897	ND	0,27	0,99	1,36	0,76	1,18	0,99	0,28	1,18	1,11	0,95	1,61
984	0,75	0,18	1,16	0,79	0,46	1,51	0,52	0,37	1,22	1,46	1,41	1,82
1039	0,46	0,13	1,21	0,79	0,17	1,06	0,53	0,11	1,38	0,51	0,42	1,16
1040	0,35	0,35	1,02	1,38	0,73	1,03	0,61	0,27	0,89	1,52	1,13	1,34
1051	0,01	0,18	0,82	0,47	0,06	0,71	ND	ND	0,75	0,49	0,32	1,03
20	0,01	0,07	0,39	0,38	0,12	0,02	ND	ND	0,05	0,74	0,38	ND
FUS	ND	0,15	1,01	1,05	0,08	1,07	0,57	ND	0,80	1,46	0,15	1,26
H2	ND	0,04	0,39	0,15	0,99	0,45	0,38	ND	0,03	0,53	1,14	0,68
LH5	ND	0,51	0,57	1,31	0,75	1,04	0,86	0,03	0,98	1,25	1,21	1,53
LD	0,11	ND	0,12	ND	0,07	ND	0,11	ND	0,05	0,14	0,03	0,02
Q10	ND	ND	0,22	0,95	0,91	1,62	0,21	0,12	1,15	0,85	0,88	1,23

ND – Atividade não-detectada

5. 2. Seleção das linhagens crescidas sob condição microaeróbia

As linhagens foram selecionadas de acordo com os melhores crescimentos visuais em menor tempo de cultivo apresentados por um número maior de fontes de carbono utilizadas.

Foram selecionadas 10 linhagens (Tabela 30) para posterior crescimento em anaerobiose, determinação das atividades de enzimas ligninolíticas e atividade de biosurfactantes, bem como a análise de degradação das fontes de carbono por CLAE.

Tabela 30 – Linhagens selecionadas quanto aos melhores crescimentos em até 30 dias de cultivo sob condição microaeróbia

Linhagem	Crescimento* e fontes de carbono e energia**
1040	(+++) AL, AT, F, C, P, Np, D / (++) N
710	(+++) AL, AT, P, D / (++) F, C, Np
Q10	(+++) F, C, P, D / (++) AL, AT, N, Np
FUS	(+++) AT, Np / (++) AL, N, F, C, P, D
1039	(+++) AL / (++) F, Np
H2	(+++) AL / (++) AT, C, P, Np, D
20	(+++) AL / (++) F, C, Np
801	(+++) AT / (++) C, Np, D
870	(+++) AL / (++) C, Np, D
984	(++) AT, F, P, Np

* Crescimentos: (+++) ótimo; (++) moderado.

**Fontes de carbono e energia utilizadas: (AL) ácido lignosulfônico; (AT) ácido tânico; (N) naftaleno; (F) fenantreno; (C) criseno; (P) perileno; (Np) naftol[2,3-a]pireno; (D) decaciclono.

PARTE II**5.3. CONDIÇÃO ANAERÓBIA****5.3.1. Crescimento das linhagens selecionadas**

As linhagens selecionadas anteriormente (Tabela 30) foram crescidas sob condição anaeróbia por 30 e 40 dias. A Tabela 31 ilustra que, de um modo geral, as linhagens apresentaram pouco crescimento (+) em condição anaeróbia nos meios de cultivo contendo as fontes de carbono estudadas. Apenas as linhagens FUS (cultivada em fenantreno) e H2 (cultivada em fenantreno, perileno e naftol[2,3-a]pireno), apresentaram moderado crescimento sob anaerobiose em 30 dias de cultivo, permanecendo inalterado até 40 dias de cultivo. No período de 40 dias, as mesmas linhagens apresentaram este mesmo crescimento para a maioria das fontes de carbono analisadas; bem como as linhagens Q10 (criseno); 1039 (naftol[2,3-a]pireno); 984 (AL, fenantreno e decaciclino).

De uma maneira geral, crescimentos dos fungos em meio contendo naftaleno (2 anéis), observou-se menores crescimentos comparados com os fungos cultivados em meio contendo fenantreno (3 anéis), ambos com mesma concentração 0,5% (m/v), devido à provável toxicidade apresentada por naftaleno para as células fúngicas (McNALLY *et al.*, 1999). Comparando-se os crescimentos fúngicos nos HAPs de maiores massas molares, as linhagens apresentaram melhores crescimentos em meio de cultivo contendo naftol[2,3-a]pireno (6 anéis), seguido de decaciclino (10 anéis), perileno (5 anéis) e criseno (4 anéis). Este comportamento de crescimento discorda de dados da literatura onde se cita que os HAPs de maiores massas molares são menos susceptíveis à degradação (CERNIGLIA & HEITKAMP, 1989; CERNIGLIA, 1992). Apesar do fenantreno apresentar-se em uma concentração 10 vezes maior que os demais HAPs de maiores massas molares, os fungos nesta fonte de carbono apresentaram melhores crescimentos em relação a todos os outros HAPs.

Os crescimentos dos fungos em anaerobiose para ácido lignosulfônico foram superiores aos apresentados para ácido tânico, ambos na mesma concentração 0,2% (m/v). As linhagens quando crescidas nas fontes de carbono apresentaram valores de pH 3-5, indicando produção de metabólitos ácidos (INGOLD & HUDSON, 1993).

Tabela 31 – Crescimento das linhagens selecionadas utilizando como fontes de carbono: ácido lignossulfônico, ácido tânico, naftaleno, fenantreno, criseno, perileno, naftol[2,3-a]pireno e decaciclono, sob condição anaeróbia e em 30 e 40 dias de cultivo.

Naftaleno				Fenantreno				Criseno				Perileno			
linhagem	30 dias	40 dias		30 dias	40 dias			30 dias	40 dias			30 dias	40 dias		
1040	+	+		+	+			+	+			-	+		
710	+	+		+	+			-	-			+	-		
Q10	+	+		+	+			+	++			+	+		
FUS	+	++		++	++			+	+			+	++		
1039	+	+		+	+			+	+			+	+		
H2	+	+		++	++			+	++			++	++		
20	-	+		-	-			+	+			+	+		
801	-	-		-	-			+	+			+	-		
870	+	+		+	+			+	+			+	+		
984	+	+		+	++			-	-			+	+		

Naftol [2,3-a]pireno				Decaciclono				Ácido lignossulfônico				Ácido tânico			
linhagem	30 dias	40 dias		30 dias	40 dias			30 dias	40 dias			30 dias	40 dias		
1040	+	+		-	+			+	+			+	+		
710	+	+		+	+			+	+			+	+		
Q10	+	+		+	+			+	+			+	+		
FUS	+	++		+	++			+	++			+	++		
1039	+	++		+	+			+	+			+	+		
H2	++	++		+	++			+	++			+	+		
20	-	+		-	+			+	+			+	+		
801	-	-		-	-			+	+			+	+		
870	+	+		+	+			+	+			+	+		
984	+	+		+	++			+	++			+	+		

(-) ausência de crescimento / (+) pouco crescimento com pequena turvação e fragmentos de micélio partindo do inóculo ou soltos no meio / (++) moderado crescimento com surgimento de "pellet" fino na superfície do meio ou ao fundo, aderido ou não no inóculo / (+++) ótimo crescimento de massa micelial da metade à todo o frasco (adaptado da ASTM Standards G21-90, 1990).

5.3.2. Atividades de enzimas ligninolíticas e Biosurfactantes (HAPs)

5.3.2.1. Naftaleno

Observa-se, pela Tabela 32, que a linhagem 1040 apresentou atividade de LiP em 30 dias (0,14 U/L.min) e 5 linhagens apresentaram atividades de LiP no 40º dia de cultivo: FUS (0,10 U/L.min); H2 (1,27 U/L.min); 20 (1,47 U/L.min); 870 (3,14 U/L.min) e 984 (0,19 U/L.min), em condição anaeróbia.

Apenas 3 linhagens: 870 (1,08 U/L.min); 1039 (0,67 U/L.min) e 20 (0,4 U/L.min) produziram atividade de MnP e em 40 dias de cultivo.

Atividades de peroxidase foram detectadas para 4 linhagens em 40 dias de cultivo: 984 (0,25 U/L.min); 710 (0,20 U/L.min); FUS (0,08 U/L.min) e 1039 (0,06 U/L.min), em meio de cultivo contendo naftaleno em condição anaeróbia.

Foi detectada a produção de lacase por algumas linhagens no 30º dia (0,04-0,35 U/L.min) e por outras no 40º dia de cultivo (0,07-0,44 U/L.min). Foi observado também a produção de tirosinase pela maioria das linhagens no 40º dia de cultivo na faixa de 0,08-1,29 U/L.min.

Em relação à produção de biosurfactantes, emulsões O/A foram produzidas pela maioria das linhagens em ambos os dias de cultivo. Porém, as formações de halos ocorreram apenas com as linhagens 984 e Q10, no 40º dia de cultivo.

A linhagem FUS, que apresentou melhor crescimento em meio de cultivo contendo naftaleno em condição anaeróbia, produziu atividades de LiP, peroxidases, lacase e tirosinase, com produção de emulsão O/A em 30 dias de cultivo.

Tabela 32 - Atividades enzimáticas (U/L.min) e produção de biosurfactantes (emulsões O/A e A/O) pelas linhagens utilizando NAFTALENO 0,5% (m/v) como fonte de carbono sob condição anaeróbia.

Naftaleno	LiP		MnP		Peroxidase		Lacase	
Linhagens	30d *	40d **	30d	40d	30d	40d	30d	40d
1040	0,14	ND	ND	ND	ND	ND	0,26	0,24
710	ND	ND	ND	ND	ND	0,20	0,35	ND
Q10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,44
FUS	ND	0,10	ND	ND	ND	0,08	0,04	0,07
1039	ND	ND	ND	0,67	ND	0,06	0,14	ND
H2	ND	1,27	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	ND	1,47	ND	0,40	ND	ND	ND	0,23
801	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
870	ND	3,14	ND	1,08	ND	ND	0,07	ND
984	ND	0,19	ND	ND	ND	0,25	0,12	ND

Tirosinase			Biosurfactantes			
Linhagens	30d	40d	30 dias		40 dias	
			Abs. ¹	Halo ²	Abs. ¹	Halo ²
1040	ND	0,77	0,17	ND	0,14	ND
710	0,03	0,76	0,05	ND	0,21	ND
Q10	ND	0,08	ND	ND	0,14	0,20
FUS	0,03	0,68	0,04	ND	0,19	ND
1039	0,04	0,57	0,13	ND	0,20	ND
H2	ND	ND	0,12	ND	0,21	ND
20	ND	0,52	ND	ND	0,17	ND
801	ND	ND	ND	ND	ND	ND
870	ND	1,29	0,05	ND	0,18	ND
984	0,24	0,34	0,11	0,50	0,37	0,50

ND – atividade não detectada

* 30 dias de cultivo / ** 40 dias de cultivo

1 – abs. 610 nm (emulsão O/A)

2 – medida do halo em cm (emulsão A/O)

5.3.2.2. Fenantreno

A Tabela 33 ilustra que não foi detectado atividade de LiP após 30 e 40 dias de cultivo das linhagens em meio contendo fenantreno, sob condição anaeróbia. A atividade de MnP foi detectada apenas para a linhagem 870 (1,17 U/L.min) após 40 dias de cultivo.

A linhagem 710 apresentou atividade de peroxidase (0,15 U/L.min) após 30 dias de cultivo; e as linhagens 1039 (0,15 U/L.min) e 1040 (0,02 U/L.min), atividades de lacase em 40 dias de cultivo.

Atividades de tirosinase foram verificadas para as linhagens Q10 (0,33 U/L.min); 1039 (0,1 U/L.min) e 870 (0,02 U/L.min) após 30 dias de cultivo e 984 (0,05 U/L.min) após 40 dias de cultivo.

Comparando-se as linhagens que apresentaram melhor crescimento em meio de cultivo contendo fenantreno, em condição anaeróbia (Tabela 31) e a produção enzimática (Tabela 33), verificou-se que as linhagens FUS e H2 não apresentaram atividades de enzimas ligninolíticas e a linhagem 984 mostrou atividade apenas de tirosinase. Em relação a estas linhagens, algumas enzimas intracelulares e/ou ligadas à membrana (DE JONG *et al.* 1993; WANG & YU, 1998; HENRIKSSON *et al.*, 2000) podem estar atuando no sistema, ocorrendo degradação da fonte de carbono por outras vias metabólicas não ligninolíticas, como por exemplo, o sistema da monooxigenase citocromo P-450 (HARAYAMA, 1997; BEZALELL, 1996 e 1997). É provável ainda a ativação pelo fungo de outras enzimas mais específicas à este composto, devido à condição anaeróbia.

Em relação à produção de biosurfactantes, a linhagem H2 apresentou emulsão O/A no 30º dia; e Q10, emulsão A/O no 40º dia de cultivo.

Tabela 33- Atividades enzimáticas (U/L.min) e produção de biosurfactantes (emulsões O/A e A/O) pelas linhagens utilizando FENANTRENO 0,5% (m/v) como fonte de carbono sob condição anaeróbia.

Fenantreno	LiP		MnP		Peroxidase		Lacase	
Linhagens	30d *	40d **	30d	40d	30d	40d	30d	40d
1040	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,02
710	ND	ND	ND	ND	0,15	ND	ND	ND
Q10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
FUS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1039	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,15
H2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
801	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
870	ND	ND	ND	1,17	ND	ND	ND	ND
984	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tirosinase			Biosurfactantes			
Linhagens	30d	40d	30 dias		40 dias	
			Abs. ¹	Halo ²	Abs. ¹	Halo ²
1040	ND	ND	0,04	ND	0,22	ND
710	ND	ND	0,18	ND	0,23	ND
Q10	0,33	ND	ND	ND	ND	0,30
FUS	ND	ND	0,17	ND	ND	ND
1039	0,10	ND	0,14	ND	0,11	ND
H2	ND	ND	0,15	ND	ND	ND
20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
801	ND	ND	ND	ND	ND	ND
870	0,02	ND	0,16	ND	ND	ND
984	ND	0,05	ND	0,80	0,06	0,70

ND – atividade não detectada

* 30 dias de cultivo / ** 40 dias de cultivo

1 – abs. 610 nm (emulsão O/A)

2 – medida do halo em cm (emulsão A/O)

5.3.2.3. Criseno

De acordo com a Tabela 34, apenas a linhagem 710 apresentou atividade de LiP no 30º dia de cultivo (0,28 U/L.min); e a linhagem FUS (0,02 U/L.min) no 40º dia no meio de cultivo contendo criseno, sob condição anaeróbia.

Apenas as linhagens H2 (3,23 U/L.min) e Q10 (0,27 U/L.min) apresentaram atividades de MnP e no 40º dia de cultivo.

A maioria das linhagens apresentou atividade de peroxidase após 30 e 40 dias de cultivo e todas as linhagens apresentaram atividade de lacase no 30º dia de cultivo.

Atividades de tirosinase também foram verificadas para todas as linhagens, com exceção de Q10 em 30 dias e 801 em 40 dias de cultivo.

Todas as linhagens produziram emulsão O/A.

Em relação às linhagens que apresentaram melhores crescimentos em criseno: Q10 e H2 só não apresentaram atividade de LiP. Ambas as linhagens produziram emulsão O/A em 30 e 40 dias de cultivo.

Tabela 34 - Atividades enzimáticas (U/L.min) e produção de biosurfactantes (emulsões O/A e A/O) pelas linhagens utilizando CRISENO 0,05% (m/v) como fonte de carbono sob condição anaeróbia.

Criseno	LiP		MnP		Peroxidase		Lacase	
Linhagens	30d [*]	40d ^{**}	30d	40d	30d	40d	30d	40d
1040	ND	ND	ND	ND	0,38	0,49	0,53	ND
710	0,28	ND	ND	ND	0,02	0,36	0,16	ND
Q10	ND	ND	ND	0,27	ND	0,22	0,54	ND
FUS	ND	0,02	ND	ND	0,27	ND	0,16	0,12
1039	ND	ND	ND	ND	0,34	0,30	0,57	0,12
H2	ND	ND	ND	3,23	0,15	0,49	0,26	ND
20	ND	ND	ND	ND	0,27	0,20	0,57	ND
801	ND	ND	ND	ND	ND	0,17	0,43	0,03
870	ND	ND	ND	ND	ND	0,51	0,31	0,20
984	ND	ND	ND	ND	ND	0,31	0,44	ND

Tirosinase			Biosurfactantes			
Linhagens	30d	40d	30 dias		40 dias	
			Abs. ¹	Halo ²	Abs. ¹	Halo ²
1040	0,16	0,05	0,01	ND	0,16	ND
710	0,25	0,36	0,17	ND	0,13	ND
Q10	ND	0,07	0,10	ND	0,15	ND
FUS	0,03	0,07	0,10	ND	0,10	ND
1039	0,06	0,02	0,01	ND	0,10	ND
H2	0,06	0,01	0,07	ND	0,12	ND
20	0,18	0,10	0,05	ND	0,09	ND
801	0,53	ND	0,04	1,00	0,05	ND
870	0,15	0,04	0,10	ND	0,15	ND
984	0,07	0,07	0,10	ND	0,01	ND

ND – atividade não detectada

* 30 dias de cultivo / ** 40 dias de cultivo

1 – abs. 610 nm (emulsão O/A)

2 – medida do halo em cm (emulsão A/O)

5.3.2.4. Perileno

Observa-se na Tabela 35, atividade de LiP apenas para as linhagens Q10 (0,05 U/L.min) e H2 (0,02 U/L.min) no 40º dia, bem como a linhagem 870 (0,008 e 0,04 U/L.min) no 30º e 40º dias de cultivo, respectivamente, em meio contendo perileno, sob condição anaeróbia.

Atividade de MnP foi detectada apenas para a linhagem FUS (1,39 U/L.min) no 30º dia de cultivo.

Apenas as linhagens 1040 e Q10 produziram peroxidase em meio de cultivo contendo perileno, em condição anaeróbia, obtendo-se 0,15 U/L.min e 0,02 U/L.min de peroxidase após 40 dias de cultivo, respectivamente. As linhagens Q10, FUS, 1039, H2, 801, 870 e 984 produziram maior atividade de lacase do que as linhagens 1040, 710 e 20 em meio de cultivo contendo perileno, sob condição anaeróbia. Todas as linhagens, com exceção das linhagens 1040 e 1039 produziram tirosinase.

A maioria das linhagens apresentou emulsão O/A após 30 e 40 dias de cultivo em meio contendo perileno, sob condição anaeróbia.

Analisando-se as linhagens com melhores crescimentos em perileno (Tabela 31) e suas respectivas atividades enzimáticas, observou-se que a linhagem FUS apresentou atividades de MnP, lacase e tirosinase; e H2, atividades de LiP, lacase e tirosinase (Tabela 35). Ambas apresentaram emulsão O/A após 30 dias de cultivo.

Tabela 35- Atividades enzimáticas (U/L.min) e produção de biosurfactantes (emulsões O/A e A/O) pelas linhagens utilizando PERILENO 0,05% (m/v) como fonte de carbono sob condição anaeróbia.

Perileno	LiP		MnP		Peroxidase		Lacase	
Linhagens	30d [*]	40d ^{**}	30d	40d	30d	40d	30d	40d
1040	ND	ND	ND	ND	ND	0,15	ND	0,06
710	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Q10	ND	0,05	ND	ND	ND	0,02	1,57	0,28
FUS	ND	ND	1,39	ND	ND	ND	1,07	ND
1039	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,30	ND
H2	ND	0,02	ND	ND	ND	ND	0,99	0,02
20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,16
801	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,21	ND
870	0,08	0,04	ND	ND	ND	ND	1,28	ND
984	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,41	ND

Tirosinase			Biosurfactantes			
Linhagens	30d	40d	30 dias		40 dias	
			Abs. ¹	Halo ²	Abs. ¹	Halo ²
1040	ND	ND	ND	ND	0,01	ND
710	0,24	ND	0,04	0,1	ND	ND
Q10	0,06	0,05	0,22	ND	ND	ND
FUS	0,25	0,57	0,15	ND	ND	ND
1039	ND	ND	0,01	ND	0,02	ND
H2	ND	0,07	0,09	ND	ND	ND
20	ND	0,10	ND	ND	0,04	ND
801	0,18	ND	ND	0,20	ND	ND
870	0,20	0,12	ND	ND	0,01	ND
984	0,07	0,11	0,19	0,50	0,05	0,70

ND – atividade não detectada

* 30 dias de cultivo / ** 40 dias de cultivo

1 – abs. 610 nm (emulsão O/A)

2 – medida do halo em cm (emulsão A/O)

5.3.2.5. Naftol [2,3-a] pireno

A Tabela 36 ilustra que as linhagens 710, Q10, FUS, 1039, H2 e 984 produziram LiP em meio de cultivo contendo naftol[2,3-a]pireno, em condição anaeróbia. Nenhuma das linhagens produziram MnP. A linhagem 801 não produziu nenhuma das enzimas testadas e nem biosurfactantes em meio contendo esta fonte de carbono sob condição anaeróbia; a linhagem 20 não produziu LiP, MnP, tirosinase e biosurfactantes, sendo somente detectado atividade de peroxidase (0,62 U/L.min) e lacase (0,39 U/L.min) após 40 dias de cultivo.

Não houve atividade de MnP em 30 e 40 dias para todas as linhagens.

Atividades de peroxidase (0,09-0,4 U/L.min), lacase (0,2-0,65 U/L.min) e tirosinase (0,03-0,37 U/L.min) também foram verificadas para quase todas as linhagens em ambos os dias de cultivo.

As linhagens que apresentaram melhores crescimentos em naftol [2,3-a] pireno como fonte de carbono: FUS, 1039 e H2 (Tabela 31), apenas não apresentaram atividades de MnP (Tabela 36). As linhagens FUS e 1039 produziram emulsão O/A e a linhagem H2, ambas as emulsões.

Tabela 36- Atividades enzimáticas (U/L.min) e produção de biosurfactantes (emulsões O/A e A/O) pelas linhagens utilizando NAFTOL[2,3-a]PIRENO 0,05% (m/v) como fonte de carbono sob condição anaeróbia.

Naftol[2,3-a] pireno								
	LiP		MnP		Peroxidase		Lacase	
Linhagens	30d *	40d **	30d	40d	30d	40d	30d	40d
1040	ND	ND	ND	ND	0,02	0,05	0,23	0,65
710	0,24	0,02	ND	ND	0,52	0,21	0,36	0,52
Q10	0,33	ND	ND	ND	0,37	0,35	0,24	0,23
FUS	0,52	0,05	ND	ND	0,13	0,64	0,33	0,31
1039	0,10	0,17	ND	ND	0,17	0,21	0,52	0,50
H2	0,17	0,21	ND	ND	0,36	0,51	0,31	0,51
20	ND	ND	ND	ND	ND	0,62	ND	0,39
801	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
870	ND	ND	ND	ND	0,22	0,22	0,31	0,42
984	0,07	0,09	ND	ND	0,09	0,12	0,16	0,20

Tirosinase			Biosurfactantes			
Linhagens	30d	40d	30 dias		40 dias	
			Abs. ¹	Halo ²	Abs. ¹	Halo ²
1040	0,13	0,14	ND	ND	ND	ND
710	0,21	0,21	ND	ND	ND	ND
Q10	0,23	0,13	ND	ND	ND	ND
FUS	0,37	0,19	0,15	ND	0,12	ND
1039	0,22	0,24	0,17	ND	0,13	ND
H2	0,13	0,21	0,19	0,50	0,15	0,40
20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
801	ND	ND	ND	ND	ND	ND
870	0,03	0,15	ND	ND	ND	ND
984	0,33	0,20	0,15	0,70	0,11	0,50

ND – atividade não detectada

* 30 dias de cultivo / ** 40 dias de cultivo

1 – abs. 610 nm (emulsão O/A)

2 – medida do halo em cm (emulsão A/O)

5.3.2.6. Decaciclono

Analisando a Tabela 37, observa-se que apenas a linhagem 1039 apresentou atividade de LiP no 30º dia (0,11 U/L.min) e 5 linhagens, no 40º dia de cultivo: 1040 (0,11 U/L.min), 710 (0,01 U/L.min), FUS (0,04 U/L.min), 20 (0,54 U/L.min) e 870 (0,07 U/L.min) em meio contendo decaciclono sob condição anaeróbia.

A linhagem 1039 também apresentou atividade de MnP no 30º dia (1,52 U/L.min), bem como as linhagens FUS (0,09 U/L.min) e 20 (3,63 U/L.min) em 40 dias de cultivo. Nenhuma das linhagens produziu peroxidase.

Não foi verificada atividade de peroxidases nos dias analisados.

Apenas as linhagens FUS (0,07 U/L.min) e 1039 (0,01 U/L.min) apresentaram atividades de lacase no 30º dia de cultivo e a linhagem 870 (0,07 U/L.min), no 40º dia.

Somente as linhagens 710, Q10, FUS, 1039, H2, 870 e 984 apresentaram atividade de tirosinase. As linhagens 710 e Q10 produziram maior atividade de tirosinase em meio contendo decaciclono sob condição anaeróbia, sendo obtido 1,27 U/L.min após 30 dias e 0,62 U/L.min após 40 dias de cultivo, respectivamente.

As linhagens que apresentaram melhores crescimentos em decaciclono (FUS, H2 e 984), observado na Tabela 31, foram produtoras de poucas enzimas ligninolíticas. A linhagem FUS não apresentou atividade de peroxidase e as linhagens H2 e 984 apresentaram apenas atividade de tirosinase, a qual encontrou-se baixa para ambas as linhagens. Neste caso, pôde ter ocorrido produção de outras enzimas com outro mecanismo de ação ou ativação de enzimas intracelulares e ligadas à membrana, nesta condição de cultivo (fator já discutido para os demais HAPs), atuando na degradação do HAP. As enzimas ligninolíticas podem estar fazendo parte da degradação inicial do HAP, podendo neste estágio já terem sido inativadas e metabolizadas pelo microrganismo, estando outras enzimas atuando neste período de análise.

Tabela 37 - Atividades enzimáticas (U/L.min) e produção de biosurfactantes (emulsões O/A e A/O) pelas linhagens utilizando DECACICLENO 0,05% (m/v) como fonte de carbono sob condição anaeróbia.

Decaciclino	LiP		MnP		Peroxidase		Lacase	
Linhagens	30d *	40d**	30d	40d	30d	40d	30d	40d
1040	ND	0,11	ND	ND	ND	ND	ND	ND
710	ND	0,01	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Q10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
FUS	ND	0,04	ND	0,09	ND	ND	0,07	ND
1039	0,11	ND	1,52	ND	ND	ND	0,01	ND
H2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	ND	0,54	ND	3,63	ND	ND	ND	ND
801	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
870	ND	0,07	ND	ND	ND	ND	ND	0,07
984	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tirosinase			Biosurfactantes			
Linhagens	30d	40d	30 dias		40 dias	
			Abs. ¹	Halo ²	Abs. ¹	Halo ²
1040	ND	ND	ND	ND	0,02	ND
710	1,27	0,13	ND	0,20	0,11	ND
Q10	ND	0,62	0,03	ND	0,01	ND
FUS	0,43	ND	ND	ND	ND	ND
1039	0,08	ND	ND	ND	0,09	ND
H2	0,08	ND	ND	ND	ND	ND
20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
801	ND	ND	ND	ND	ND	ND
870	ND	0,03	0,10	ND	ND	ND
984	0,09	0,08	ND	ND	0,03	ND

ND – atividade não detectada

* 30 dias de cultivo / ** 40 dias de cultivo

1 – abs. 610 nm (emulsão O/A)

2 – medida do halo em cm (emulsão A/O)

5. 3. 3. Atividade das enzimas ligninolíticas (AL e AT)

5.3.3.1. Ácido Lignosulfônico

A Tabela 38 ilustra que as maiores atividades de LiP foram apresentadas pelas linhagens 1040 e 801 (8,60 U/L.min) e 984 (8,50 U/L.min) em 30 dias de cultivo e em meio contendo AL, sob condição anaeróbia. No 40º dia, foi detectado atividade apenas para a linhagem H2 (3,37 U/L.min) e 1039 (4,04 U/L.min).

Apenas as linhagens 984 (2,42 U/L.min) e 1039 (1,21 U/L.min) cultivadas em 30 dias apresentaram atividade de MnP, em meio contendo AL sob anaerobiose. A enzima peroxidase (0,03-0,67 U/L.min) e lacase (0,02-0,38 U/L.min) foram produzidas pela maioria das linhagens em ambos os dias de cultivo. A linhagem 870 não produziu nenhuma das enzimas testadas em meio contendo AL sob anaerobiose.

Em relação às linhagens com melhores crescimentos em AL: FUS e H2 apresentaram atividades de LiP, peroxidase e lacase; e 984, de LiP, MnP e peroxidase.

Tabela 38 - Atividades enzimáticas (U/L.min) produzidas pelas linhagens utilizando ÁCIDO LIGNOSULFÔNICO 0,2% (m/v) como fonte de carbono sob condição anaeróbia.

AL	LiP		MnP		Peroxidase		Lacase	
Linhagens	30d *	40d **	30d	40d	30d	40d	30d	40d
1040	8,60	ND	ND	ND	ND	0,33	ND	0,30
710	ND	ND	ND	ND	0,12	0,36	0,02	ND
Q10	ND	ND	ND	ND	0,03	0,60	0,35	0,36
FUS	2,49	ND	ND	ND	0,30	0,31	0,13	0,38
1039	0,86	4,04	1,21	ND	0,13	0,49	0,21	0,15
H2	0,57	3,37	ND	ND	0,08	0,07	ND	0,18
20	3,57	ND	ND	ND	0,14	0,67	0,21	0,36
801	8,60	ND	ND	ND	0,07	0,43	0,05	0,02
870	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
984	8,54	ND	2,42	ND	ND	0,27	ND	ND

* 30 dias de cultivo / ** 40 dias de cultivo

ND – atividade não detectada

5.3.3.2. Ácido Tânico

De acordo com a Tabela 39, apenas as linhagens H2 (17,0 U/L.min); 710 (2,69 U/L.min) e 1039 (2,42 U/L.min) apresentaram atividades de MnP no 30º dia, bem como 984 (9,46 U/L.min) e H2 (8,83 U/L.min) no 40º dia de cultivo em meio contendo AT sob anaerobiose.

Atividade de peroxidase (0,03-0,42 U/L.min) e lacase (0,03-0,56 U/L.min) foi verificada para a maioria das linhagens em ambos os dias de cultivo.

Nenhuma das linhagens produziu LiP e a linhagem 870 não produziu nenhuma das enzimas testadas nesta fonte de carbono sob condição anaeróbia.

A linhagem FUS que apresentou melhor crescimento em meio contendo AT sob condição anaeróbia (Tabela 31) produziu peroxidase e lacase, porém, não produziu LiP e MnP após 30 e 40 dias de cultivo.

Tabela 39 - Atividades enzimáticas (U/L.min) produzidas pelas linhagens utilizando ÁCIDO TÂNICO 0,2% (m/v) como fonte de carbono sob condição anaeróbia.

AT	LiP		MnP		Peroxidase		Lacase	
Linhagens	30d *	40d **	30d	40d	30d	40d	30d	40d
1040	ND	ND	ND	ND	0,34	0,42	0,56	0,31
710	ND	ND	2,69	ND	0,15	ND	0,22	0,09
Q10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,03	ND
FUS	ND	ND	ND	ND	0,24	0,03	0,49	ND
1039	ND	ND	2,42	ND	0,17	ND	0,23	0,05
H2	ND	ND	16,99	8,83	ND	0,41	0,09	0,18
20	ND	ND	ND	ND	ND	0,07	0,16	0,12
801	ND	ND	ND	ND	0,28	0,25	0,42	0,30
870	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
984	ND	ND	ND	9,46	ND	ND	ND	ND

ND – atividade não detectada

* 30 dias de cultivo / ** 40 dias de cultivo

PARTE III**5.4. Degradação dos HAPs, ácido lignosulfônico, ácido tânico e comparação das atividades enzimáticas sob condições microaeróbia e anaeróbia**

A determinação da degradação dos HAPs, ácido lignosulfônico e ácido tânico foi realizada em 30 dias de cultivo para as condições microaeróbia e anaeróbia, cujos melhores resultados estão apresentados nos cromatogramas que se seguem, de acordo com a fonte de carbono. Os gráficos apresentados referem-se às atividades de enzimas ligninolíticas apresentadas para 30 dias de cultivo sob ambas as condições, comparando-se com a porcentagem de degradação apresentada pelas mesmas linhagens.

5.4.1. Naftaleno

Analizando-se as Figuras 16 e 17, verifica-se maior degradação de naftaleno pela linhagem 984 (46,5%) sob condição microaeróbia, apesar de pouca atividade determinada de MnP e ausência de fenoloxidasas.

A linhagem Q10 apresentou boa degradação de naftaleno sob condição anaeróbia de 22,1%; porém, não foram verificadas atividades de enzimas ligninolíticas sob esta condição. Embora tenha apresentado os melhores resultados de lacase e tirosinase em microaerobiose, esta linhagem apresentou degradação de 8,1% nesta condição.

A linhagem H2 apresentou altos valores de degradação em ambos os sistemas com relação às demais linhagens: 33% em microaerobiose e 17,7% em anaerobiose; porém, nenhuma atividade de enzima ligninolítica foi verificada no 30º dia de cultivo. Provavelmente, tal fato tenha ocorrido pela produção de outras enzimas (já discutidas anteriormente) para este sistema de cultivo, ou ainda, enzimas ligninolíticas podem ter sido produzidas e terem suas atividades expressas anteriormente ao 30º dia, sendo absorvidas posteriormente pela falta de função após determinado período.

Em condição anaeróbia os HAPs são mais estáveis à biodegradação pela clivagem dos anéis aromáticos na ausência de oxigênio (BOCKNY & STRAND, 1998). Porém, naftaleno (5 mg/L) foi mineralizado por bactérias redutoras de nitrato em menos de 15 dias de cultivo sob condição anaeróbia (ROCKNE & STRAND, 1998). Bactérias anaeróbias foram capazes de degradar 30% de naftaleno em mistura de HAPs com diferentes concentrações após 50 dias (JOHNSON & GHOSH, 1998). GRISHCHENKOV e colaboradores (2000) após mesmo período de cultivo, determinaram degradação de naftaleno de, aproximadamente 14% por um consórcio de bactérias anaeróbias crescidas em petróleo.

Culturas puras de bactérias também foram capazes de mineralizar naftaleno (0,001 mg/L) em menos de 12 horas em mistura de HAPs (McNALLY, 1998). A degradação de naftaleno utilizado como única fonte de carbono por culturas fúngicas puras em concentração 0,5% (m/v) apresentou taxas bem relevantes, tanto para condição microaeróbia quanto para anaerobiose.

Em relação à degradação por fungos, CLEMENTE *et al.* (2001) verificaram degradação de naftaleno 5% (m/v); 0,5 - 80% em 6 dias e 5,1 - 39,4% em 10 dias; todavia, em sistema aeróbio. Os resultados de degradação apresentados neste presente trabalho são relevantes, uma vez que se trata de condição de baixa oxigenação ou anóxica.

Atividade das enzimas ligninolíticas e degradação do naftaleno

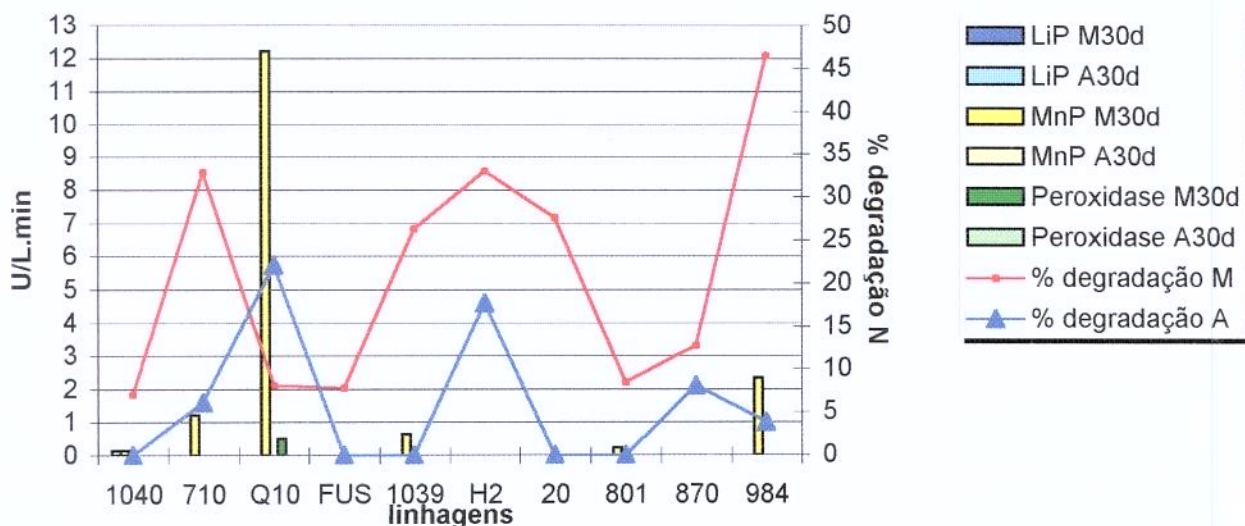


Figura 16 – Atividades de Lignina-peroxidase (LiP), Manganês-peroxidase (MnP) e peroxidase produzidas pelas linhagens cultivadas em **naftaleno** (N) sob condições microaeróbia (M) e anaeróbia (A) em 30 dias de cultivo (30d); e porcentagem de degradação pelas linhagens sob as mesmas condições.

Atividade das enzimas ligninolíticas e degradação do naftaleno

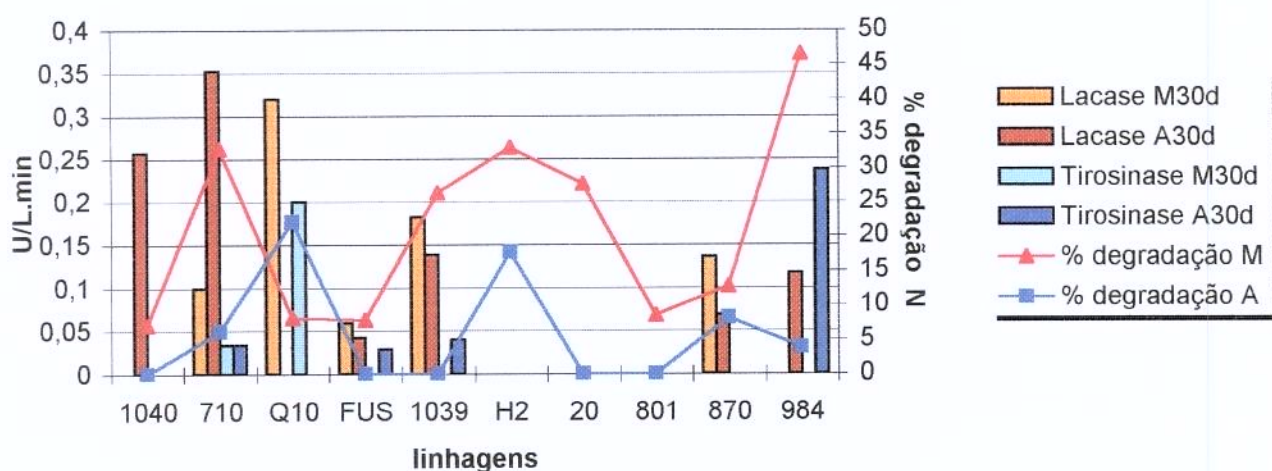


Figura 17 – Atividades das fenoloxidasas lacase e tirosinase produzidas pelas linhagens cultivadas em **naftaleno** (N) sob condições microaeróbia (M) e anaeróbia (A) em 30 dias de cultivo (30d); e porcentagem de degradação pelas linhagens sob as mesmas condições.

As figuras a seguir ilustram as melhores degradações de naftaleno pela linhagem 984 em condição microaeróbia (Figura 18) e a linhagem H2 em condições microaeróbia (Figura 19) e anaeróbia (Figura 20).

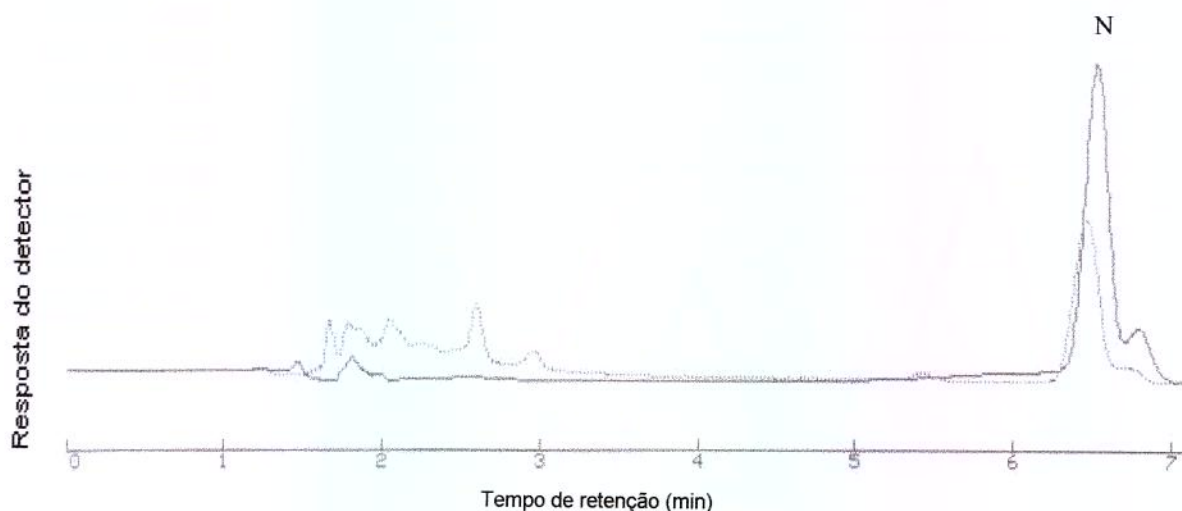


Figura 18 – Cromatogramas das amostras contendo naftaleno (N) extraído do controle abiótico (linha contínua) e extraído do meio de cultivo da linhagem 984 (linha tracejada): 30 dias sob condição microaeróbia.

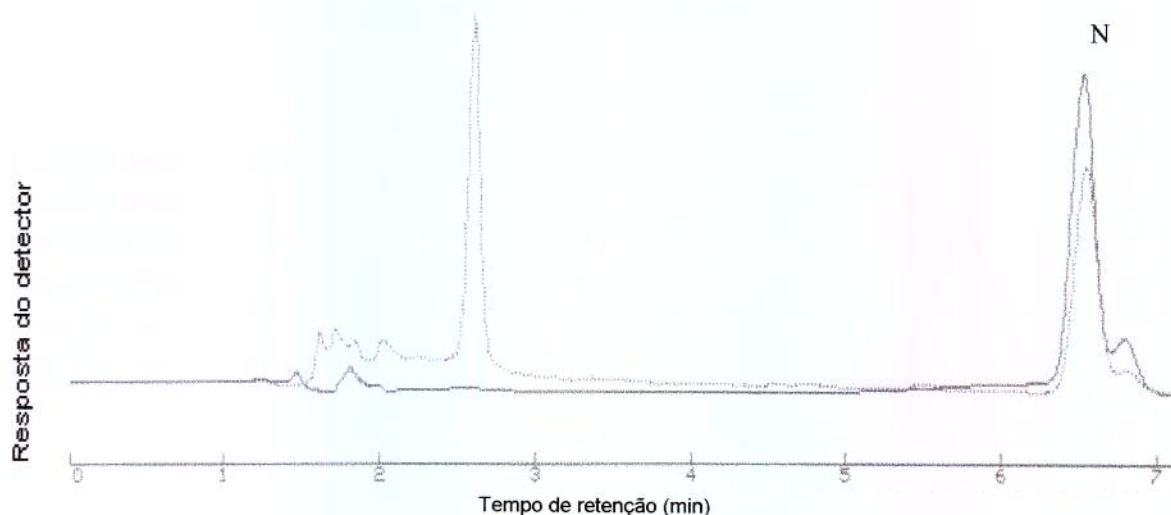


Figura 19 – Cromatogramas das amostras contendo naftaleno (N) extraído do controle abiótico (linha contínua) e extraído do meio de cultivo da linhagem H2 (linha tracejada): 30 dias sob condição microaeróbia.

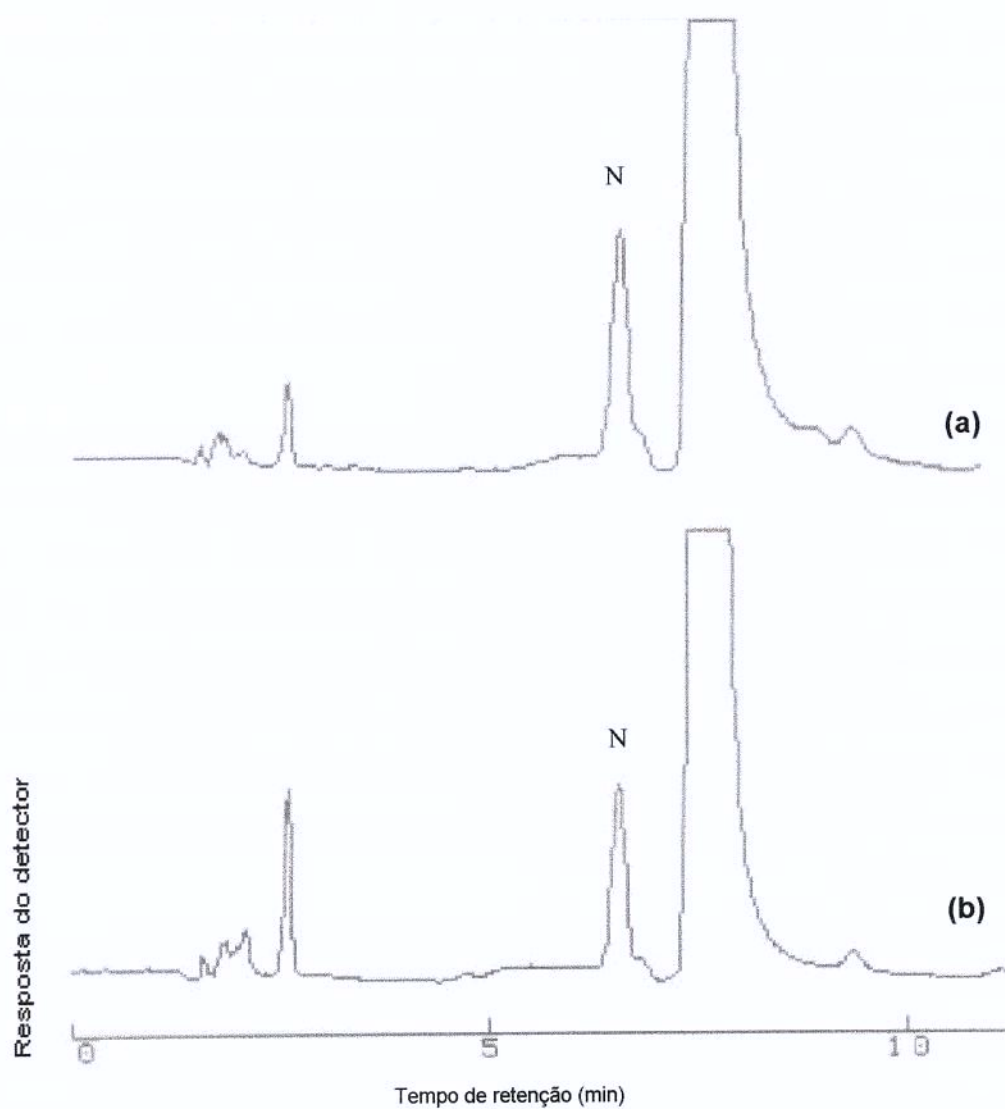


Figura 20 – Cromatogramas das amostras contendo naftaleno (N) extraído do controle abiótico (a) e extraído do meio de cultivo da linhagem H2 (b), em 30 dias sob condição anaeróbia.

5.4.2. Fenantreno

De acordo com as Figuras 21 e 22, a linhagem 984 apresentou maior degradação de fenantreno (25%) sob condição microaeróbia; porém, não houve atividade de enzimas ligninolíticas em 30 dias de cultivo. A linhagem FUS apresentou maior degradação de fenantreno em sistema anaeróbio (13,2%); no entanto, as atividades de enzimas ligninolíticas neste dia de cultivo também não foram detectadas. A linhagem Q10 apresentou uma das melhores degradações em ambos os cultivos: em microaerobiose (21,9%), sendo acompanhada pelas atividades mais altas de MnP, lacase e tirosinase; e anaerobiose (11,5%), acompanhada por maior atividade de tirosinase.

CLEMENTE e colaboradores (2001) determinaram taxas de degradação de fenantreno 5% (m/v) por fungos ligninolíticos de 7,5-95% em 10 dias de cultivo em condição aeróbia. Degradações aeróbias por culturas puras dos fungos basidiomicetos *P. ostreatus* e *P. chrysosporium* foram reportadas por SUN e colaboradores (1998), onde 83% de fenantreno (10 ppm) foi degradado em 5 dias, inoculados em meio com limitação de nitrogênio. CANET e colaboradores (2001) obtiveram apenas 8% de degradação do fenantreno em consórcio de fungos basidiomicetos: *P. ostreatus*, *P. chrysosporium* e *C. versicolor* em uma mistura de HAPs, por 35 dias.

Em relação à degradação anaeróbia de fenantreno, bactérias anaeróbias apresentaram taxa de 70% em 50 dias de cultivo (JOHNSON & GHOSH, 1998), utilizando mistura de HAPs (onde fenantreno possuía uma concentração inicial de 10 mg/kg de solo). Segundo MARCOUX *et al.* (2000), a utilização de alguns HAPs de menores massas molares como naftaleno e fenantreno junto a vários HAPs com altas massas molares como fonte de carbono, aumenta a biodegradabilidade da mistura. YUAN & CHANG (2000) analisaram fenantreno (5 mg/L) como única fonte de carbono e energia e verificaram mineralização em 48 horas por bactérias anaeróbias.

Os resultados aqui apresentados foram interessantes, uma vez que a maioria dos fungos não-basidiomicetos apresentou níveis consideráveis de degradação nestas condições de cultivo.

Atividade das enzimas ligninolíticas e degradação do fenantreno

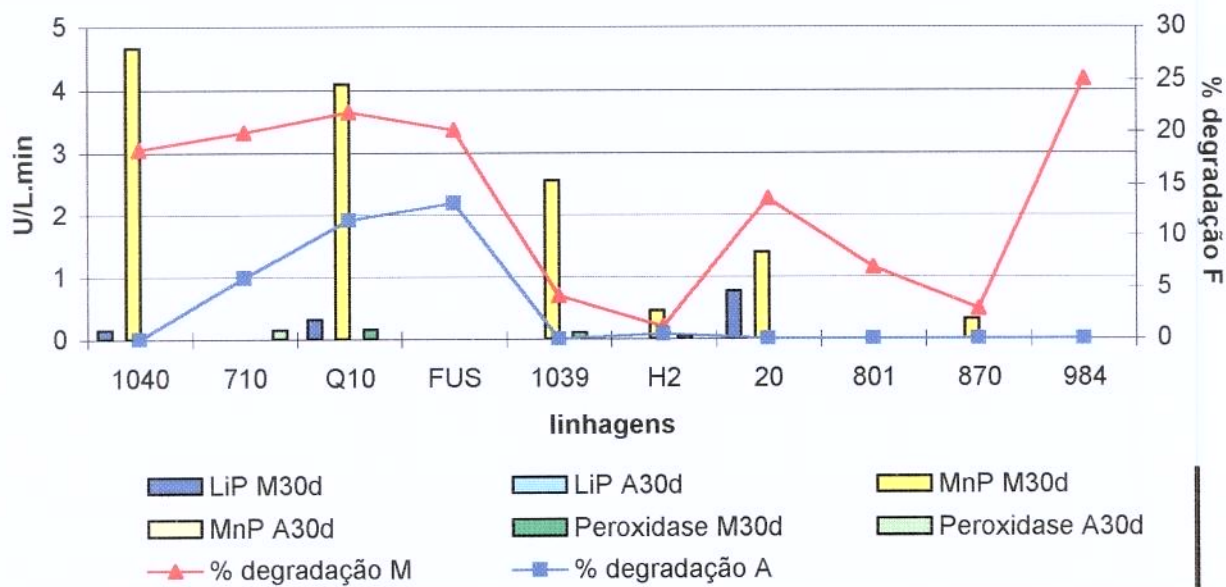


Figura 21– Atividades de Lignina-peroxidase (LiP), Manganês-peroxidase (MnP) e peroxidase produzidas pelas linhagens cultivadas em **fenantreno** (F) sob condições microaeróbica (M) e anaeróbica (A) em 30 dias de cultivo (30d); e porcentagem de degradação pelas linhagens sob as mesmas condições.

Atividade das enzimas ligninolíticas e degradação do fenantreno

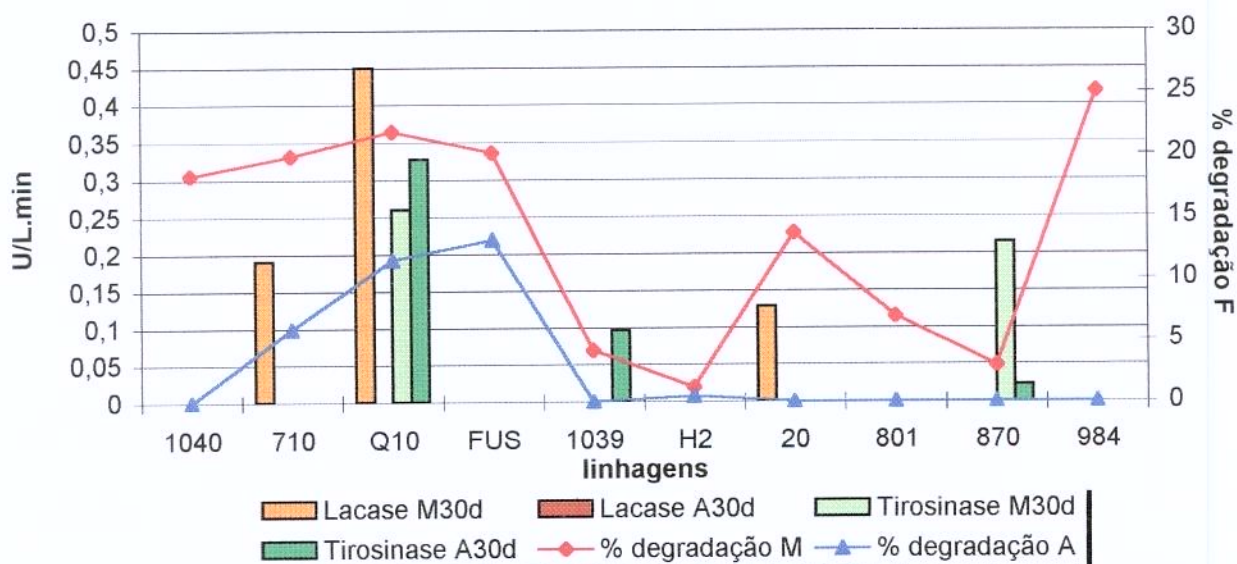


Figura 22 – Atividades das fenoloxidasas lacase e tirosinase produzidas pelas linhagens cultivadas em **fenantreno** (F) sob condições microaeróbica (M) e anaeróbica (A) em 30 dias de cultivo (30d); e porcentagem de degradação pelas linhagens sob as mesmas condições.

As figuras a seguir ilustram as melhores degradações ocorridas de fenantreno pelas linhagens 984 (Figura 23) e Q10 (Figura 24) sob condição microaeróbia e pelas linhagens FUS (Figura 25) e Q10 (Figura 26) sob condição anaeróbia.

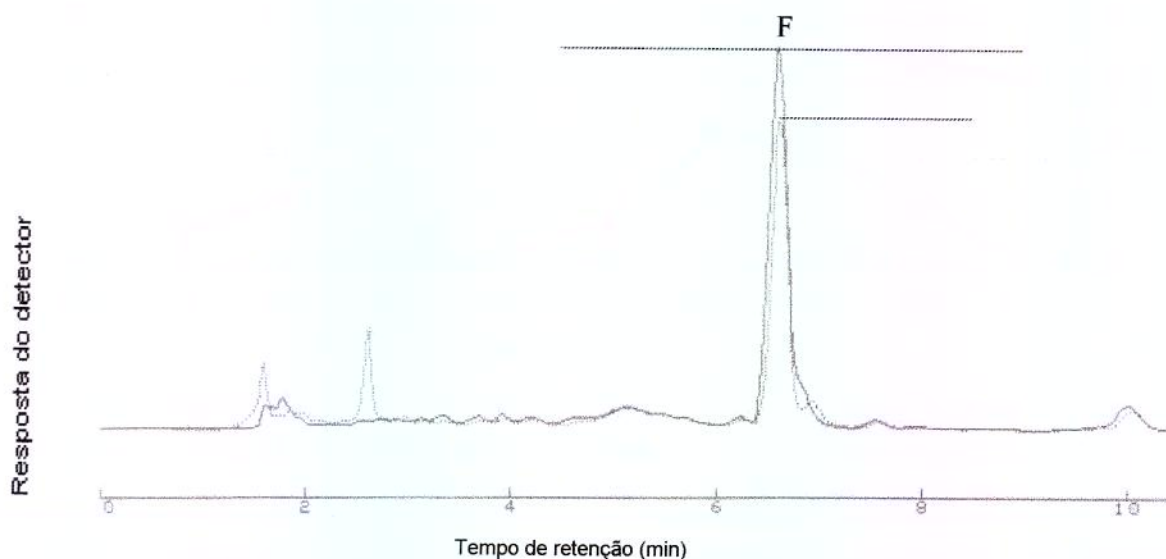


Figura 23 – Cromatogramas das amostras contendo fenantreno (F) extraído do controle abiótico (linha contínua) e extraído do meio de cultivo da linhagem 984 (linha tracejada), em 30 dias sob condição microaeróbia.

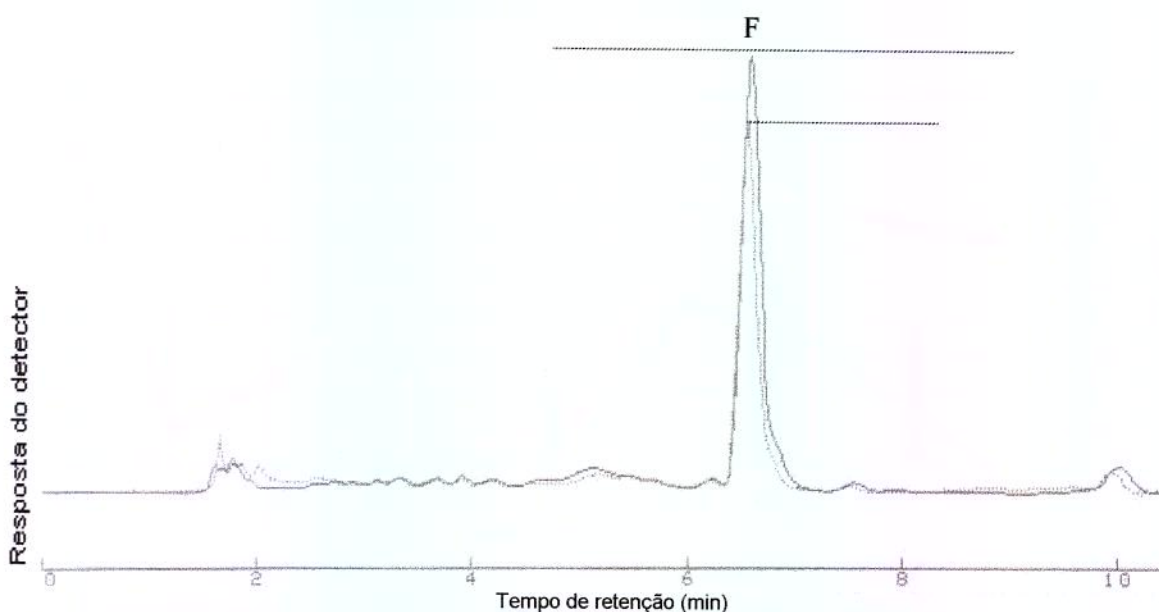


Figura 24 – Cromatogramas das amostras contendo fenantreno (F) extraído do controle abiótico (linha contínua) e extraído do meio de cultivo da linhagem Q10 (linha tracejada), em 30 dias sob condição microaeróbia.

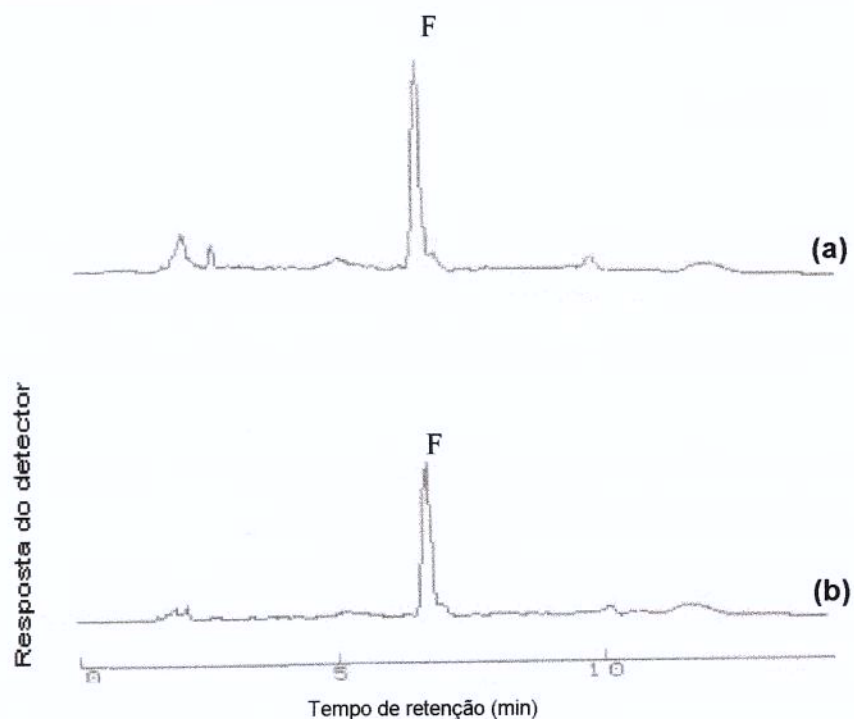


Figura 25 – Cromatogramas das amostras contendo fenantreno (F) extraído do controle abiótico (a) e extraído do meio de cultivo da linhagem FUS (b), em 30 dias sob condição anaeróbia.

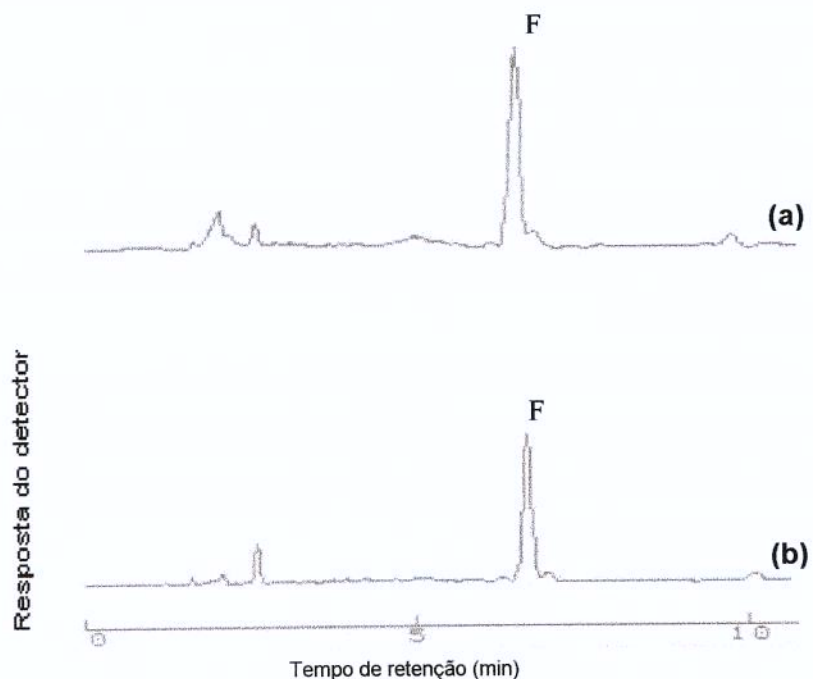


Figura 26 – Cromatogramas das amostras contendo fenantreno (F) extraído do controle abiótico (a) e extraído do meio de cultivo da linhagem Q10 (b), em 30 dias sob condição anaeróbia.

5.4.3. Criseno

De acordo com as Figuras 27 e 28, a linhagem Q10 apresentou maior degradação de criseno em condição microaeróbia (40,8%) e relevantes atividades de lacase e tirosinase com relação à produção destas enzimas pelas demais linhagens.

A linhagem 20 apresentou maior degradação de criseno sob condição anaeróbia (34,4%) e atividades de lacase e tirosinase.

Em um consórcio de fungos basidiomicetos (CANET *et al.*, 2001) inoculados em solo contaminado com HAPs não houve a degradação de criseno em 32 semanas. Esta fonte de carbono pode ser biotransformada, porém, não mineralizada por fungos filamentosos. Os metabólitos produzidos pela biotransformação do criseno são menos estáveis à degradação (KIEHLMANN *et al.*, 1996).

Experimentos realizados em solos artificialmente contaminados com HAPs, resultaram em 81% de degradação destes compostos após 15 semanas, sob condição aeróbia (WISCHMANN & STEINHART, 1997).

Em relação à condição anaeróbia, um consórcio de bactérias degradou 45% do criseno presente em uma mistura de 15 HAPs, após 50 dias de cultivo (JOHNSON & GHOSC, 1998). Porém, McRAE & HALL (1998) verificaram máxima degradação de criseno de 28% em uma mistura com 9 HAPs de média massa molecular após 12 semanas.

Neste presente trabalho, os fungos foram cultivados como culturas puras utilizando criseno como única fonte de carbono, sendo verificado no final de 30 dias de cultivo, relevantes resultados de degradação deste composto sob condições microaeróbia e anaeróbia.

Atividade das enzimas ligninolíticas e degradação do criseno

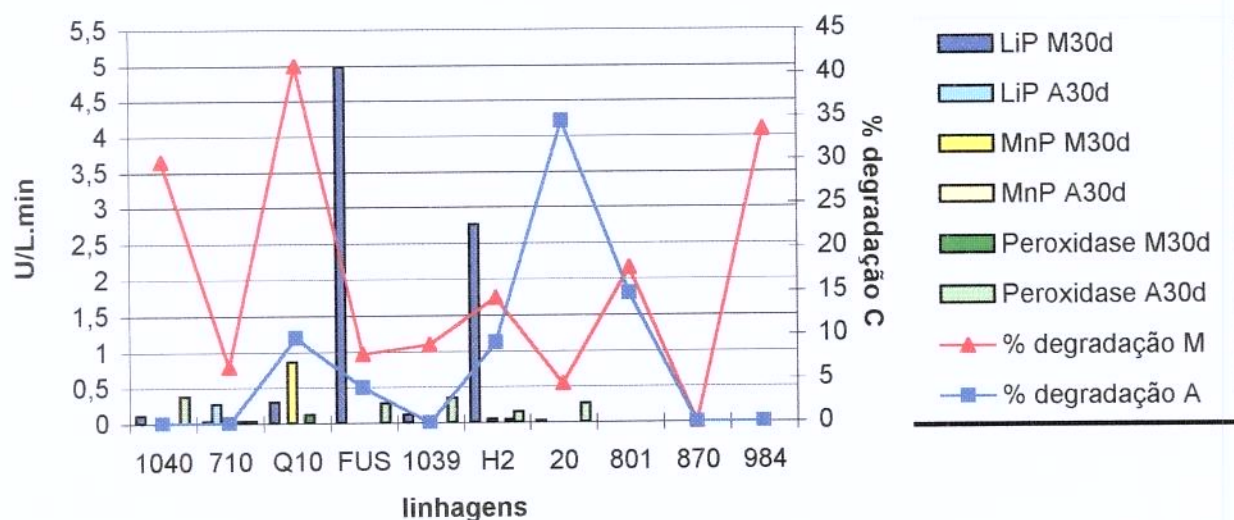


Figura 27 – Atividades de Lignina-peroxidase (LiP), Manganês-peroxidase (MnP) e peroxidase produzidas pelas linhagens cultivadas em **criseno** (C) sob condições microaeróbica (M) e anaeróbica (A) em 30 dias de cultivo (30d); e porcentagem de degradação pelas linhagens sob as mesmas condições.

Atividade das enzimas ligninolíticas e degradação do criseno

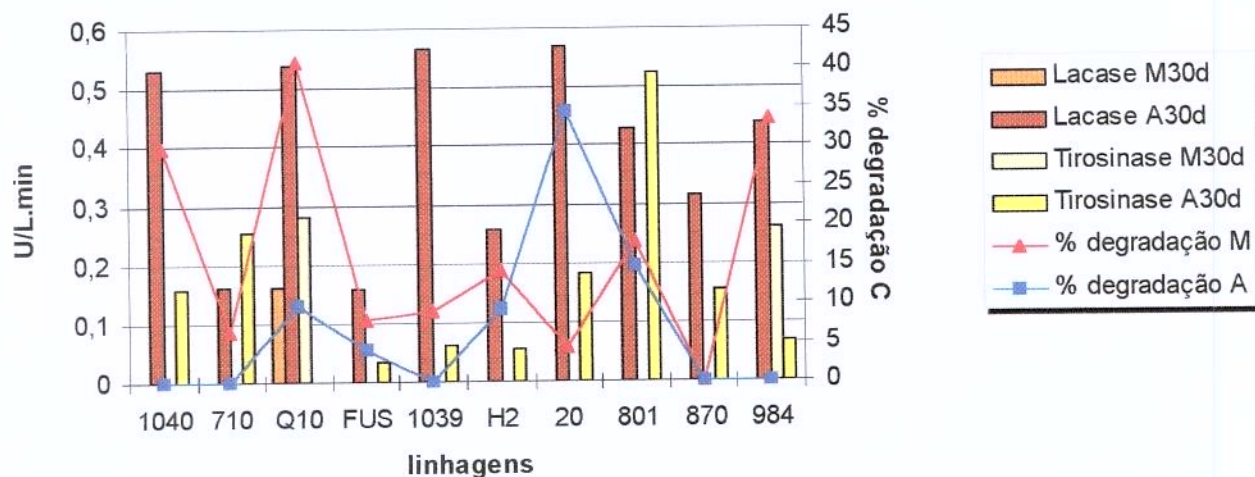


Figura 28 – Atividades das fenoloxidasas lacase e tirosinase produzidas pelas linhagens cultivadas em **criseno** (C) sob condições microaeróbica (M) e anaeróbica (A) em 30 dias de cultivo (30d); e porcentagem de degradação pelas linhagens sob as mesmas condições.

As figuras a seguir ilustram as melhores degradações de criseno, realizada pela linhagem Q10 em condição microaeróbia (Figura 29) e pela linhagem 20 em condição anaeróbia (Figura 30).

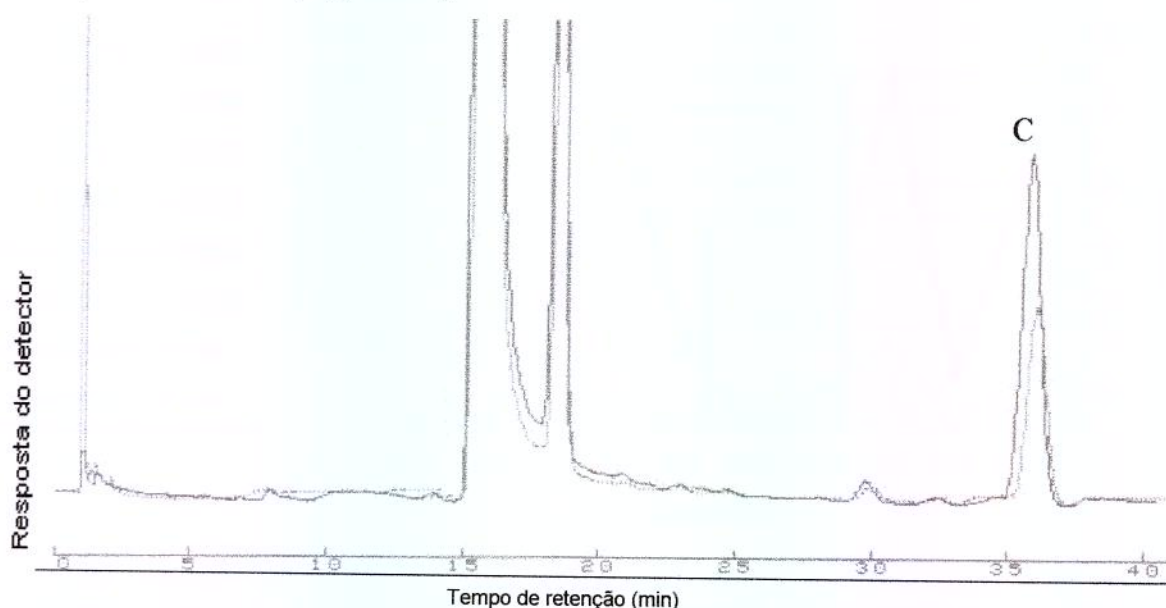


Figura 29 – Cromatogramas das amostras contendo criseno (C) extraído do controle abiótico (linha contínua) e extraído do meio de cultivo da Q10 (linha tracejada), em 30 dias sob condição microaeróbia.

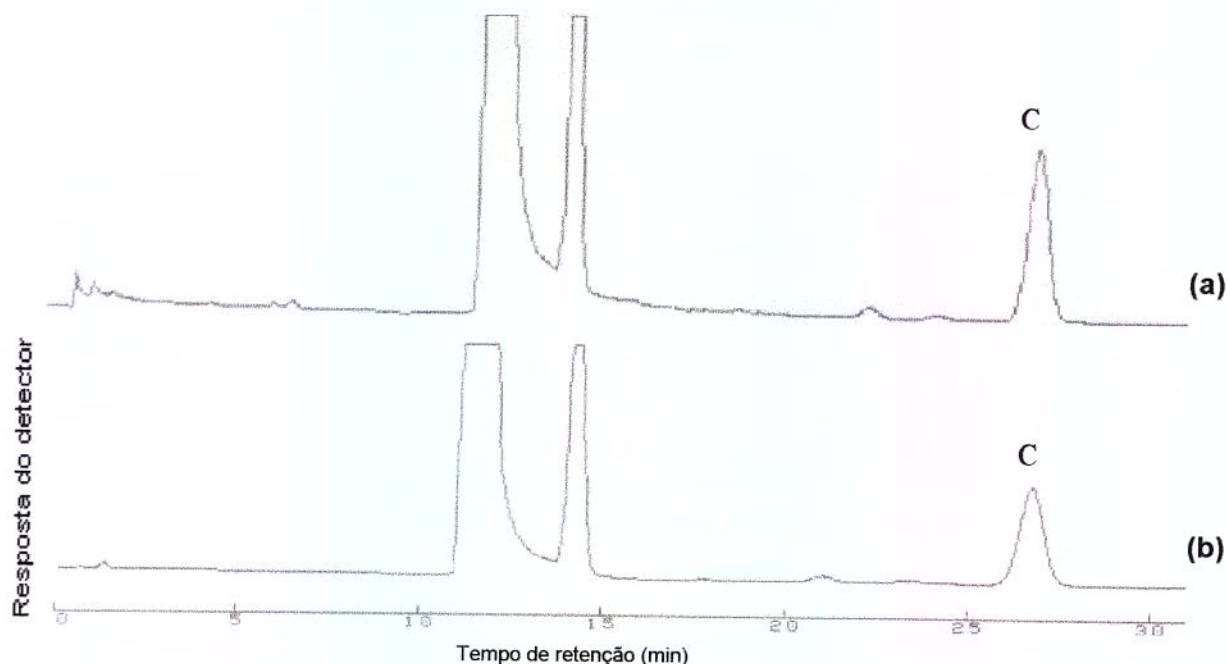


Figura 30 – Cromatogramas das amostras contendo criseno (C) extraído do controle abiótico (a) e extraído do meio de cultivo da linhagem 20 (b), em 30 dias sob anaerobiose.

5.4.4. Perileno

Analisando-se as Figuras 31 e 32, observa-se que a linhagem 984 apresentou maior degradação de perileno sob condição microaeróbia (37%) com baixa produção de enzimas ligninolíticas. A linhagem H2 apresentou a segunda maior degradação desta fonte de carbono em condição microaeróbia (34,2%); porém, com pouca atividade de peroxidases e lacase. Outras enzimas não-ligninolíticas podem estar atuando na degradação deste HAP, ativadas por esta condição de cultivo. Em condição anaeróbia, a mesma linhagem apresentou uma das maiores degradações de perileno (17,9%) e apenas atividade de lacase. A linhagem 710 apresentou maior degradação em sistema anaeróbio (20,5%), destacando-se pela atividade de tirosinase.

Estudos sobre a degradação de perileno não foram reportados em literatura. O HAP benzo(a)pireno, de igual número de anéis benzênico, tem sido alvo de muitos estudos em degradação de solos e *in vitro*, pela sua propriedade de toxicidade aguda e carcinogenicidade (CAMARGO, 2000). O fungo *Penicillium janthinellum* e a bactéria *Stenotrophomonas maltophilia*, quando incubados em cocultura foram capazes de degradar HAPs maiores ou iguais a 5 anéis aromáticos (35-59%) em 56 dias de cultivo sob condição aeróbia (BOONCHAN *et al.*, 2000). A mineralização de 25% de benzo (a) pireno, utilizado como única fonte de carbono foi verificada também por esta cocultura após 49 dias de cultivo. CANET e colaboradores (2001) relataram degradação de HAPs maiores ou iguais a 5 anéis aromáticos por fungos basidiomicetos em consórcio, crescidos em mistura de HAPs de várias massas molares e concentrações (aproximadamente 12% em 32 semanas de cultivo aeróbio).

Em relação à degradação anaeróbia de HAPs, indeno (1,2,3-cd) pireno (com 5 anéis aromáticos semelhante a perileno) foi degradado em uma taxa de 8% após 50 dias por bactérias anaeróbias em reator (JOHNSON & GHOSH, 1998).

A atuação das linhagens fúngicas neste presente trabalho foi relevante na degradação de perileno, uma vez que se trataram de culturas puras incubadas com este composto como única fonte de carbono sob condições não propícias ao crescimento da maioria dos fungos.

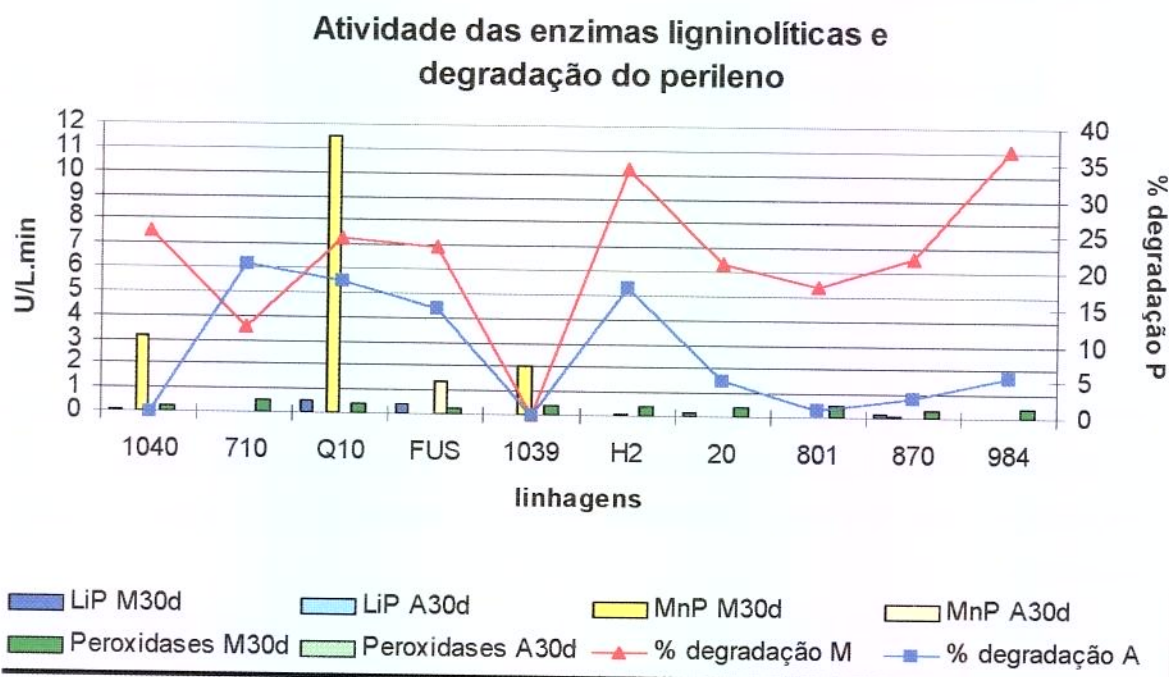


Figura 31 – Atividades de Lignina-peroxidase (LiP), Manganês-peroxidase (MnP) e peroxidase produzidas pelas linhagens cultivadas em **perileno** (P) sob condições microaeróbia (M) e anaeróbia (A) em 30 dias de cultivo (30d); e porcentagem de degradação pelas linhagens sob as mesmas condições.

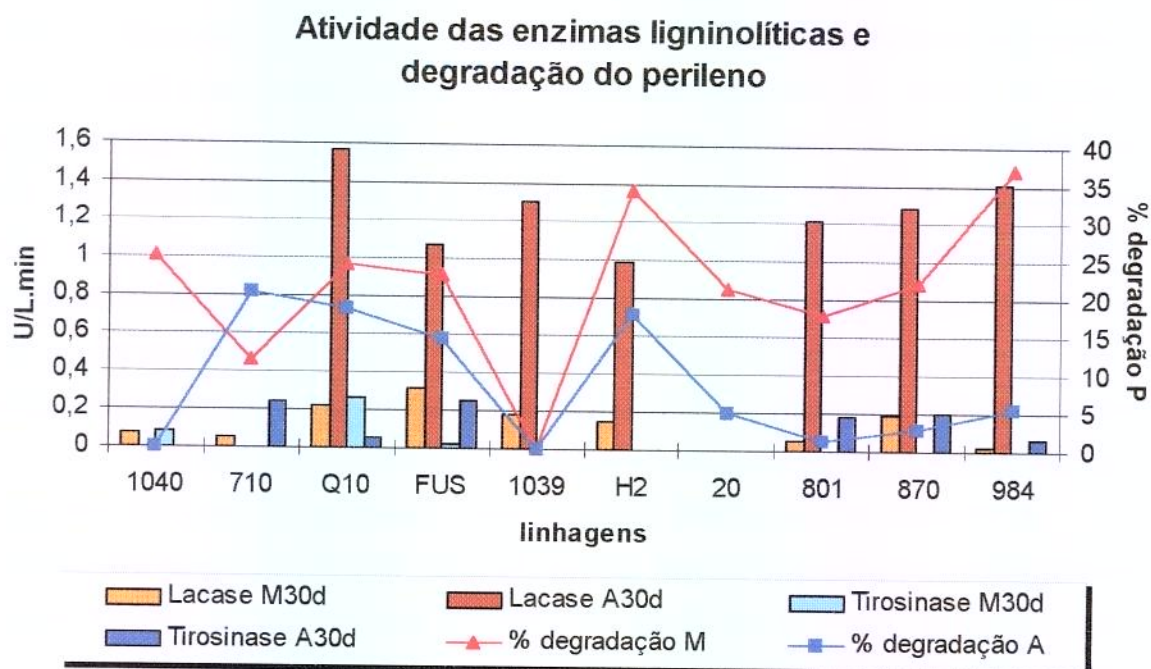


Figura 32 – Atividades das fenoloxidas lacase e tirosinase produzidas pelas linhagens cultivadas em **perileno** (P) sob condições microaeróbia (M) e anaeróbia (A) em 30 dias de cultivo (30d); e porcentagem de degradação pelas linhagens sob as mesmas condições.

As figuras abaixo, ilustram as melhores degradações de perileno realizada pela linhagem H2 em condições microaeróbia (Figura 33) e anaeróbia (Figura 34).

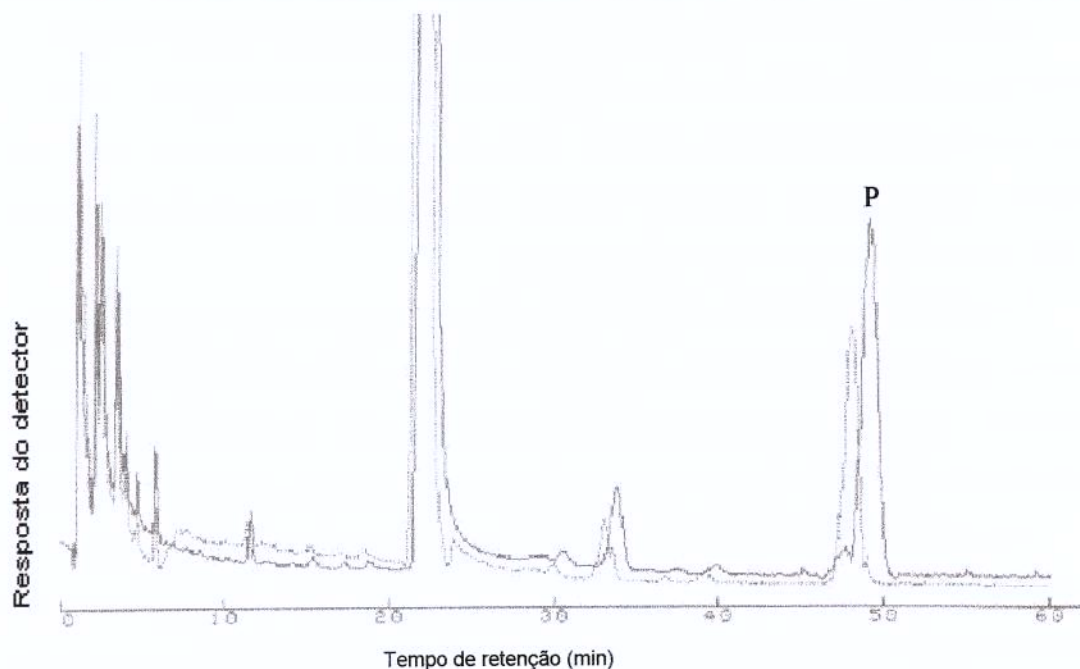


Figura 33 – Cromatogramas das amostras contendo perileno (P) extraído do controle abiótico (linha contínua) e extraído do meio de cultivo da linhagem H2 (linha tracejada), em 30 dias sob condição microaeróbia.

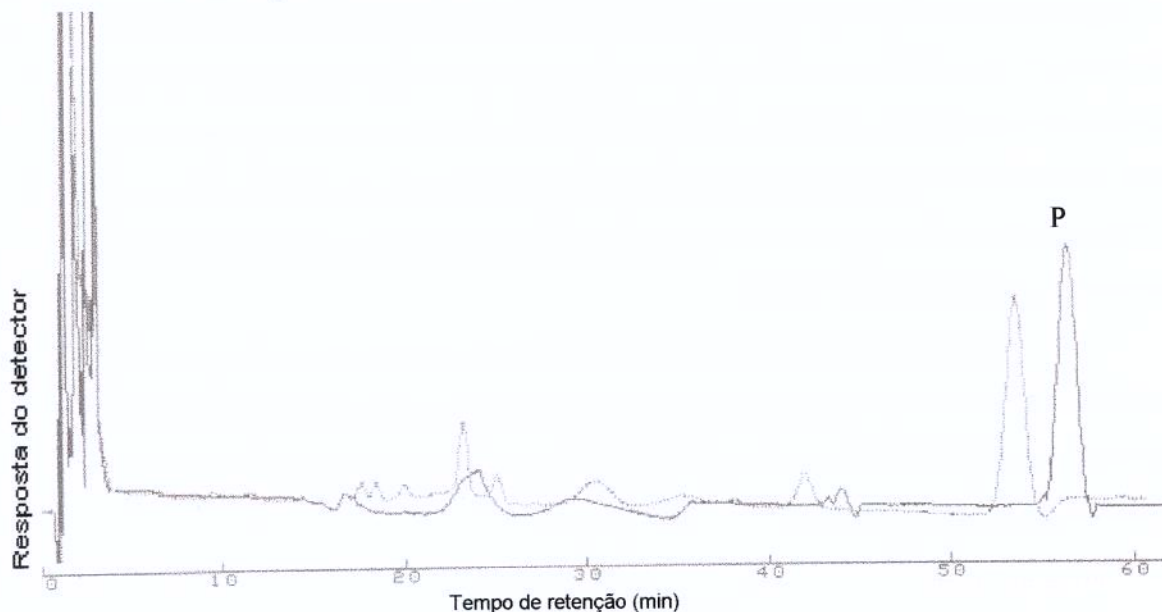


Figura 34 – Cromatogramas das amostras contendo perileno (P) extraído do controle abiótico (linha contínua) e extraído do meio de cultivo da linhagem H2 (linha tracejada), em 30 dias sob condição anaeróbia.

5.4.5. Naftol [2,3-a] pireno

Analisando-se as Figuras 35 e 36, pode-se observar que a linhagem 1040 apresentou maior degradação deste HAP em microaerobiose (40,8%), verificou-se maior atividade de atividades de LiP, além de MnP e peroxidase. Esta mesma linhagem apresentou a segunda melhor degradação em condição anaeróbia (12,4%) e atividades de lacase e tirosinase.

A linhagem H2 também apresentou degradação de 12,4% para naftol[2,3-a]pireno, porém em condição anaeróbia, sendo detectado atividade de LiP, peroxidase, lacase e tirosinase não muito elevadas comparando-se com os resultados de atividade destas enzimas verificados para as demais linhagens.

Não foram encontrados na literatura estudos sobre degradação de naftol [2,3-a] pireno. Poucos autores estudaram a degradação de HAPs com altas massas molares. Compostos com mais de 6 anéis foram estudados por CANET e colaboradores (2001) com consórcio de fungos de degradação branca, apresentando degradação de 12,7 - 28,1%, após 32 semanas de cultivo aeróbio. Benzo(ghi)perileno, compostos de aproximada massa molar do naftol[2,3-a]pireno foi degradado em taxa aproximada de 25% após 50 dias por bactérias anaeróbias em mistura de HAPs em diferentes concentrações (JONHSON & GHOSH, 1998). De acordo com estes autores, a degradação de HAPs mais complexos parece ser mais efetiva em consórcio bacteriano do que utilizando-se fungos. Os fungos não-basidiomicetos são capazes de degradar HAPs de alta massa molar em condição aeróbia (LAUNEN *et al.*, 1995).

Os resultados obtidos para este composto neste presente trabalho foram importantes, uma vez que fungos não-basidiomicetos (com exceção de H2) foram capazes de utilizar HAPs mais complexos como fonte de carbono sob condição de baixa oxigenação e anóxica.

Atividade das enzimas ligninolíticas e degradação do nafto [2,3-a] pireno

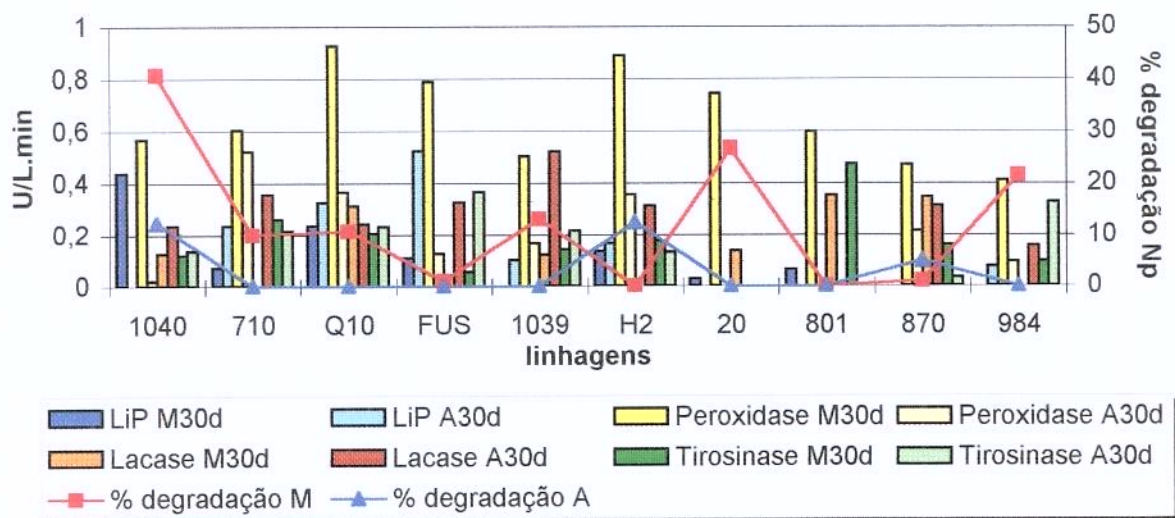


Figura 35 - Atividades de Lignina-peroxidase (LiP), peroxidase, lacase e tirosinase produzidas pelas linhagens cultivadas em **naftol[2,3-a] pireno** (Np) sob condições microaeróbia (M) e anaeróbia (A) em 30 dias de cultivo (30d); e porcentagem de degradação pelas linhagens sob as mesmas condições.

Atividade das enzimas ligninolíticas e degradação do naftol[2,3-a]pireno

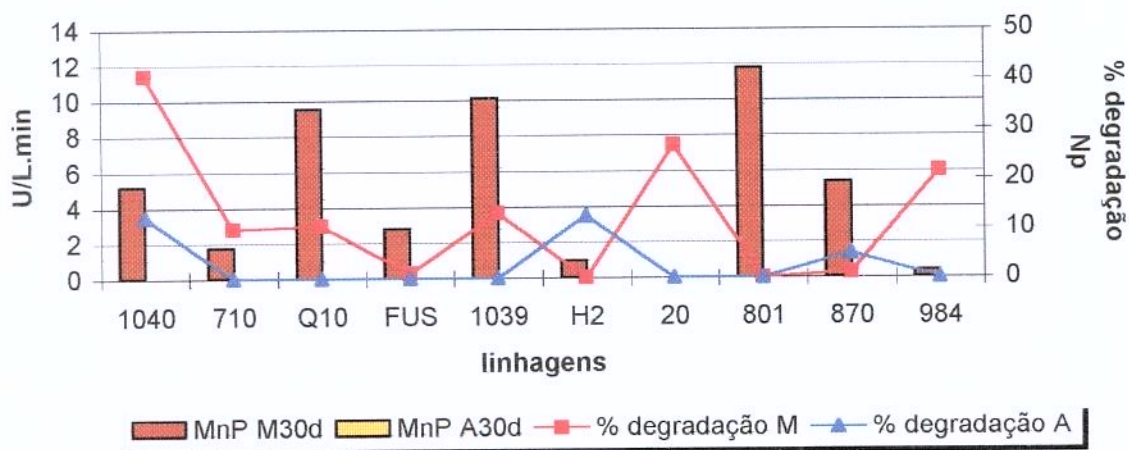


Figura 36 – Atividade de Manganês-peroxidase (MnP) produzida pelas linhagens cultivadas em **naftol[2,3-a] pireno** (Np) sob condições microaeróbia (M) e anaeróbia (A) em 30 dias de cultivo (30d); e porcentagem de degradação pelas linhagens sob as mesmas condições.

As figuras abaixo, ilustram as melhores degradações de naftol [2,3-a] pireno sob condição microaeróbia (Figura 37), realizada pela linhagem 1040 e sob condição anaeróbia (Figura 38), realizada pela linhagem H2.

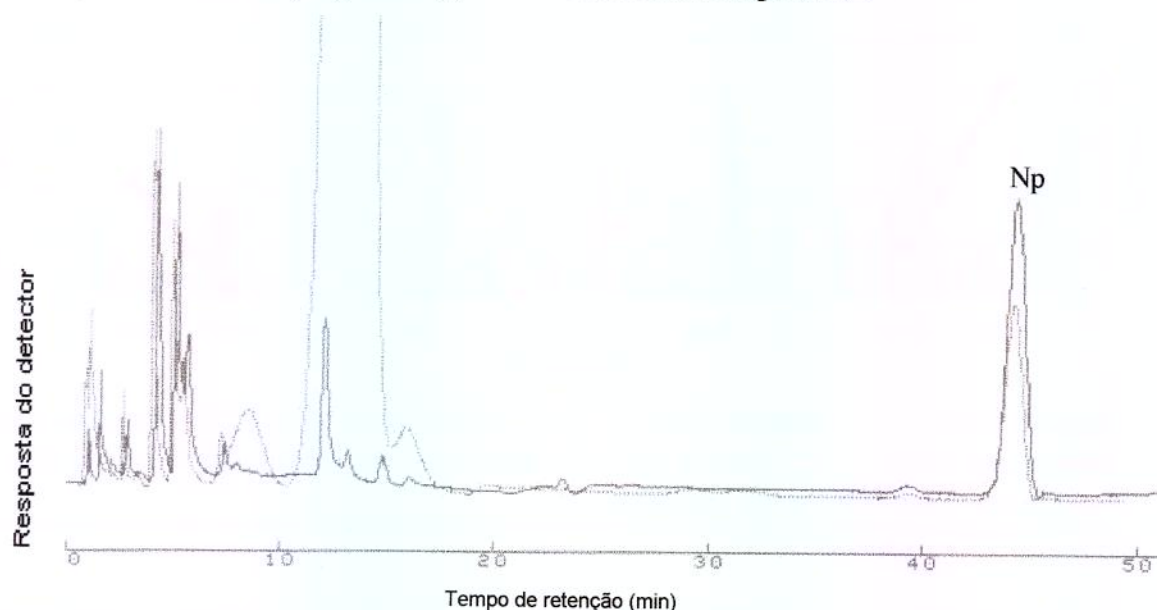


Figura 37 – Cromatogramas das amostras contendo naftol[2,3-a]pireno (Np) extraído do controle abiótico (linha contínua) e extraído da linhagem 1040 (linha tracejada) crescida em 30 dias, sob condição microaeróbia.

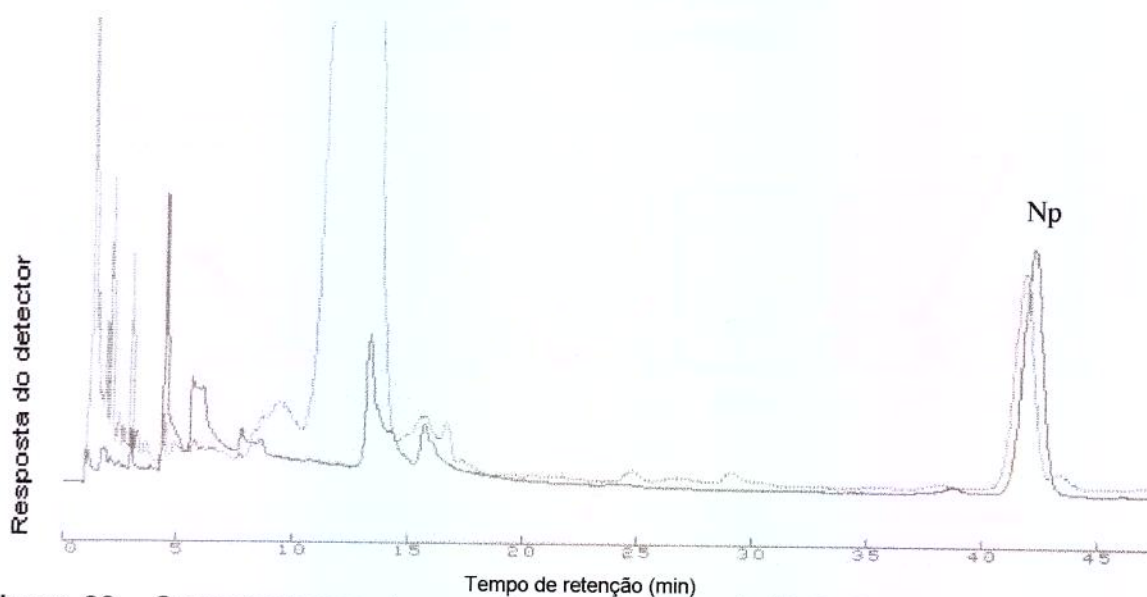


Figura 38 – Cromatogramas das amostras contendo naftol[2,3-a]pireno (Np) extraído do controle abiótico (linha contínua) e extraído da linhagem H2 (linha tracejada) crescida em 30 dias, sob condição anaeróbia.

5.4.6. Decaciclono

As Figuras 39, 40 e 41 ilustram a degradação de decaciclono e a produção de enzimas ligninolíticas pelas linhagens em condições microaeróbia e anaeróbia. A linhagem 984 apresentou degradação de decaciclono sob condição microaeróbia (37,7%), porém, exibindo pouca atividade de LiP, peroxidases e lacase e nenhuma atividade de MnP e tirosinase.

A linhagem Q10 apresentou relevante degradação de decaciclono ainda em microaerobiose (37,3%) e as maiores atividades de LiP, outras peroxidases e lacase. A mesma linhagem apresentou a maior degradação de decaciclono sob condição anaeróbia (18,8%); no entanto, nenhuma atividade de enzimas ligninolíticas foi verificada sob esta condição. Fato este que pode ser explicado pela provável presença de outras enzimas (como as intracelulares ou ligadas à membrana) que estejam atuando nesta fonte de carbono utilizando outros mecanismos para a condição em questão (DE JONG *et al.*, 1993; BEZALEL *et al.*, 1997; WANG & YU, 1996; HENRIKSSON *et al.*, 2000).

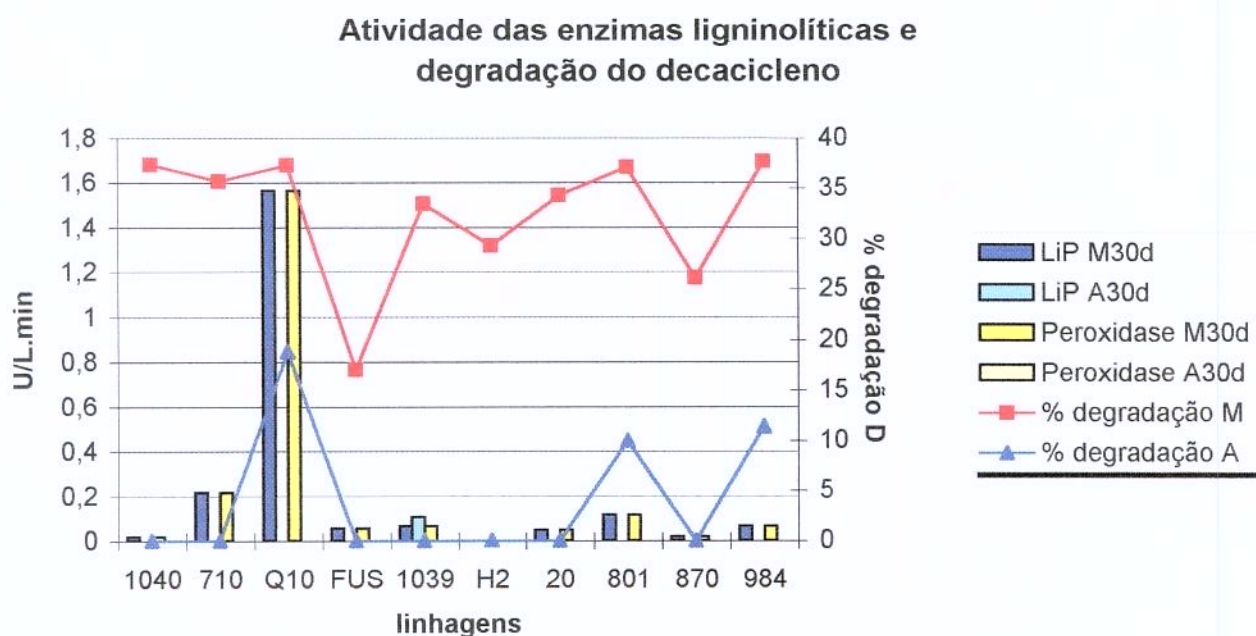


Figura 39 - Atividades de Lignina-peroxidase (LiP) e peroxidase produzidas pelas linhagens cultivadas em **decaciclono** (D) sob condições microaeróbia (M) e anaeróbia (A) em 30 dias de cultivo (30d); e porcentagem de degradação pelas linhagens sob as mesmas condições.

Atividade das enzimas ligninolíticas e degradação do decaciclono

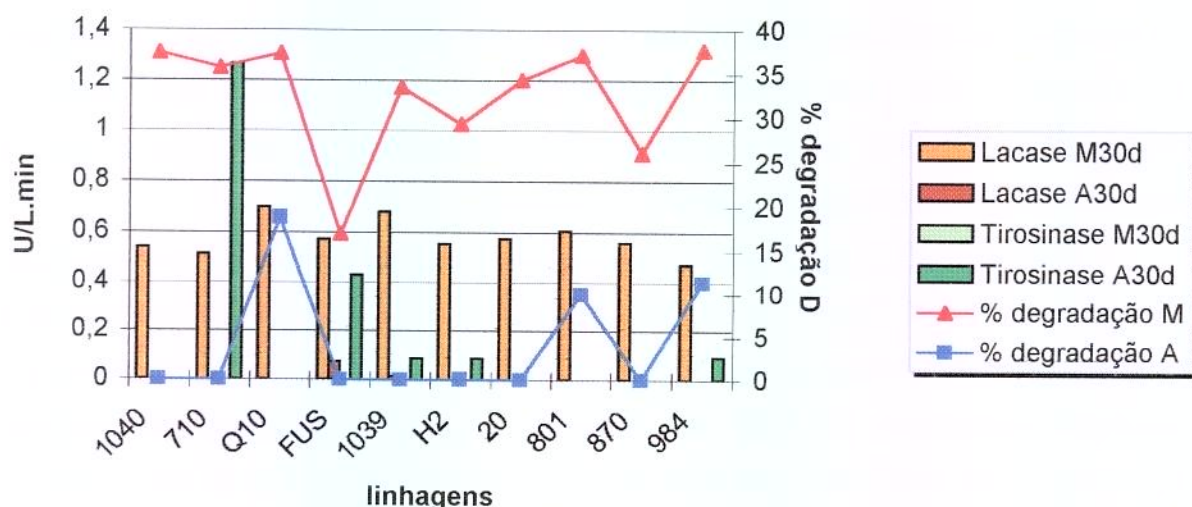


Figura 40 – Atividades de lacase e tirosinase produzidas pelas linhagens cultivadas em **decaciclono** (D) sob condições microaeróbia (M) e anaeróbia (A) em 30 dias de cultivo (30d); e porcentagem de degradação pelas linhagens sob as mesmas condições.

Atividade das enzimas ligninolíticas e degradação do decaciclono

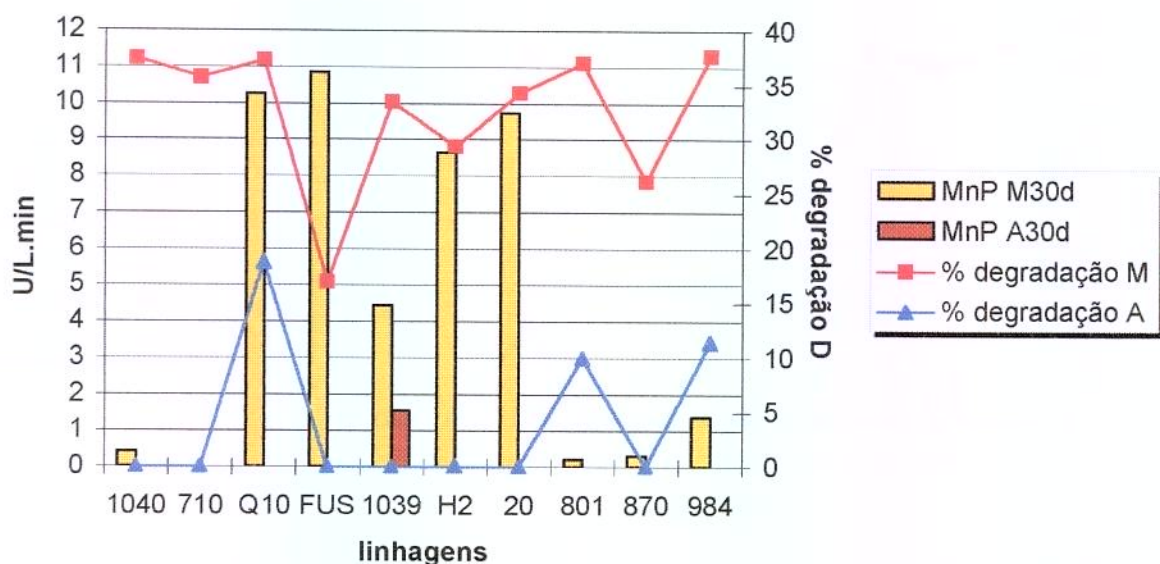


Figura 41 – Atividade de Manganês-peroxidase (MnP) produzida pelas linhagens cultivadas em **decaciclono** (D) sob condições microaeróbia (M) e anaeróbia (A) em 30 dias de cultivo (30d); e porcentagem de degradação pelas linhagens sob as mesmas condições.

As figuras a seguir, ilustram as melhores degradações verificadas para decaciclono em condição microaeróbia (Figura 42), realizada pela linhagem 984; e em condição anaeróbia (Figura 43), realizada pela linhagem Q10.

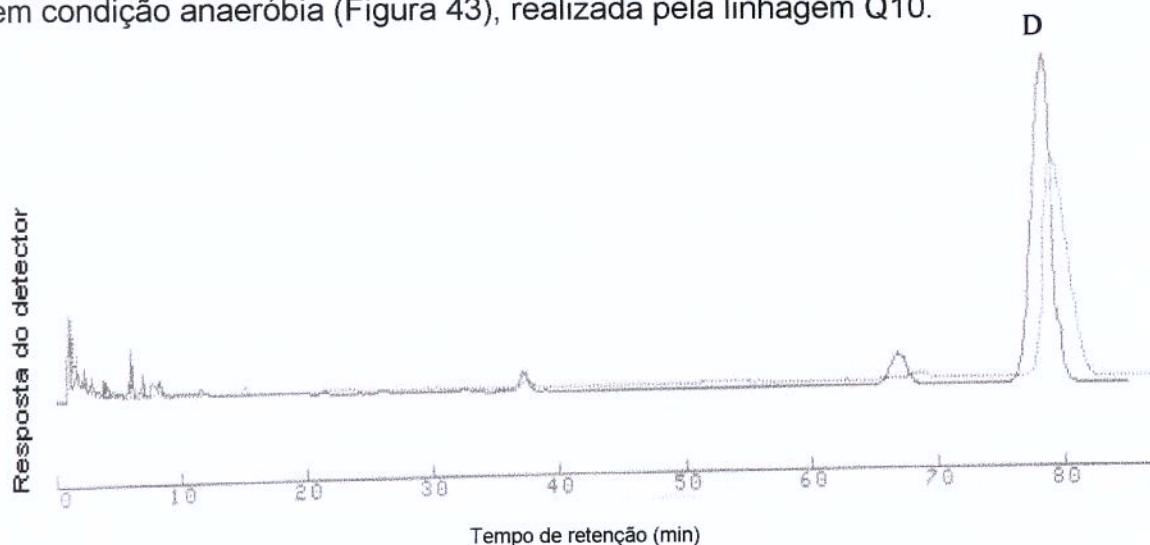


Figura 42 – Cromatogramas das amostras contendo decaciclono (D) extraído do controle abiótico (linha contínua) e extraído da linhagem 984 (linha tracejada) crescida em 30 dias, sob condição microaeróbia.

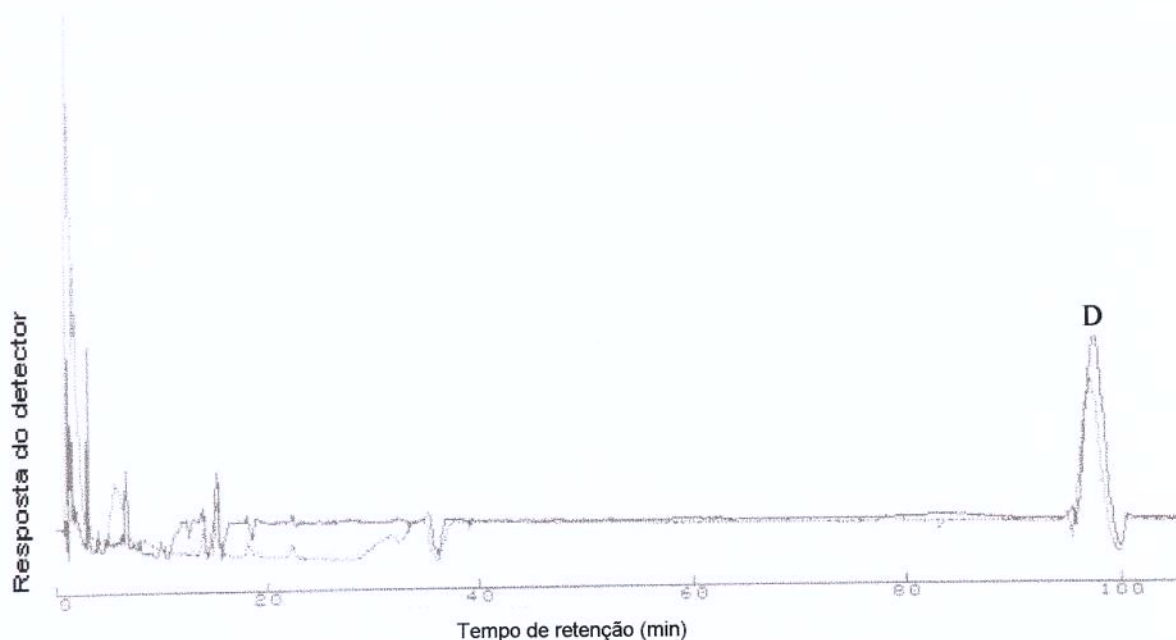


Figura 43 - Cromatogramas das amostras contendo decaciclono (D) extraído do controle abiótico (linha contínua) e extraído da linhagem Q10 (linha tracejada) crescida em 30 dias, sob condição anaeróbia.

5.4.7. Ácido Lignosulfônico

Analisando-se as Figuras 44 e 45, observa-se que a linhagem 1040 apresentou maior degradação do compostos em microaerobiose (27,5%) e maior atividade de LiP, não havendo produção de tirosinase por esta linhagem. Em anaerobiose, a mesma linhagem apresentou degradação de 32,5%; superior à apresentada na condição microaeróbia.

Para a linhagem 984 foi verificada uma das maiores degradações em microaerobiose (26,5%), a qual apresentou maior atividade de lacase. Para a linhagem 20 foi determinada maior degradação em anaerobiose (33,5%) e produção de LiP. Atividades de lacase e tirosinase também foram detectadas para esta linhagem.

Resultados de degradação deste composto foram obtidos também por FALCONI (1998) por fungos não-basidiomicetos cultivados sob condição estacionária em 3 (degradação máxima de 1,3%) e 7 dias (degradação máxima de 34,2%), quando utilizando AL 0,5% (m/v). SETTE (1997) demonstrou ainda que fungos não-basidiomicetos também foram capazes de degradar ácido lignosulfônico 0,5% (m/v) em cultivo microaeróbio por 35 dias (7-10,5%). Tais resultados, porém, foram inferiores aos apresentados no presente trabalho.

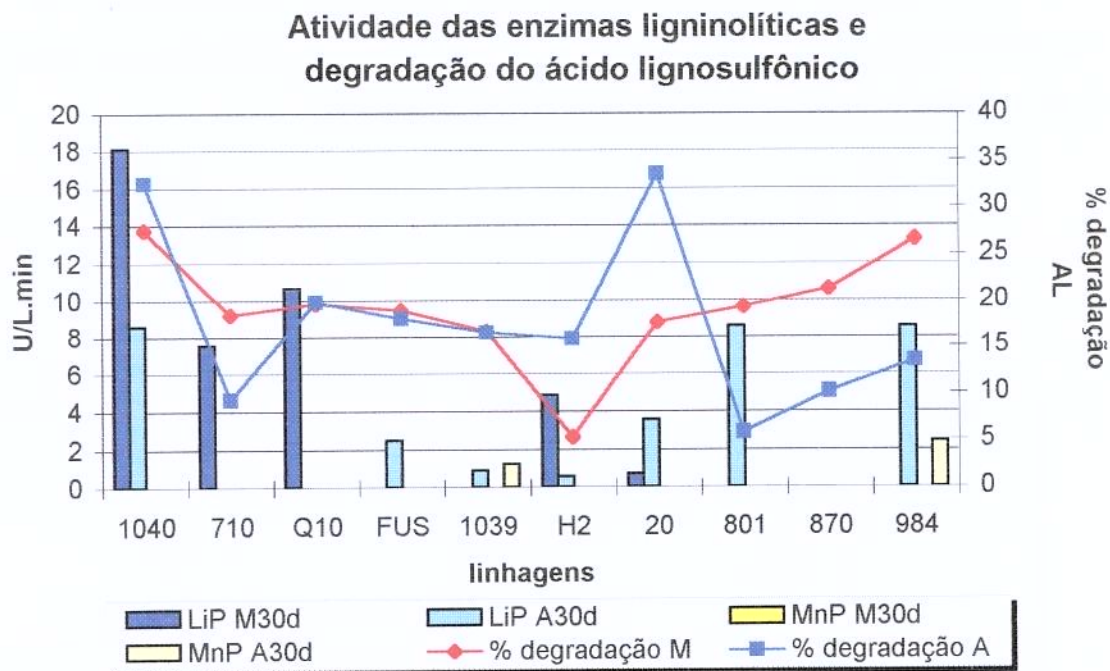


Figura 44 – Atividades de Lignina-peroxidase (LiP) e Manganês-peroxidase (MnP) produzidas pelas linhagens cultivadas em **ácido lignosulfônico** (AL) sob condições microaeróbia (M) e anaeróbia (A) em 30 dias de cultivo (30d); e porcentagem de degradação pelas linhagens sob as mesmas condições.

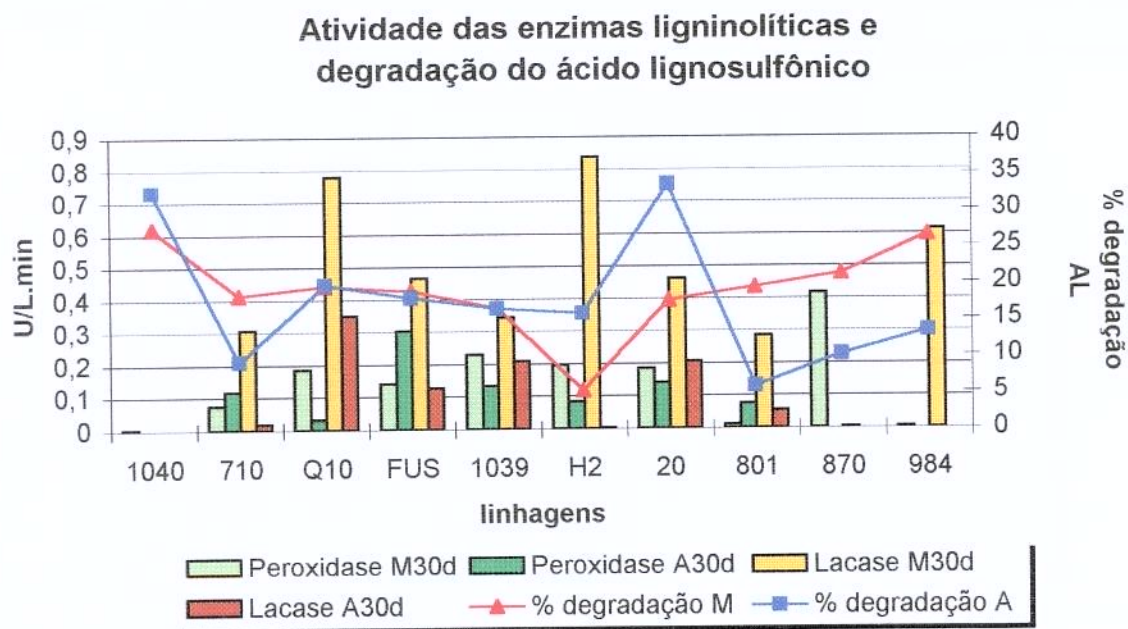


Figura 45 – Atividades de peroxidase e lacase produzidas pelas linhagens cultivadas em **ácido lignosulfônico** (AL) sob condições microaeróbia (M) e anaeróbia (A) em 30 dias de cultivo (30d); e porcentagem de degradação pelas linhagens sob as mesmas condições.

As Figuras abaixo ilustram as melhores degradações de ácido lignosulfônico em condição microaeróbia (Figura 46) pelas linhagens 1040 e 984; e em condição anaeróbia (Figura 47) pela linhagem 20.

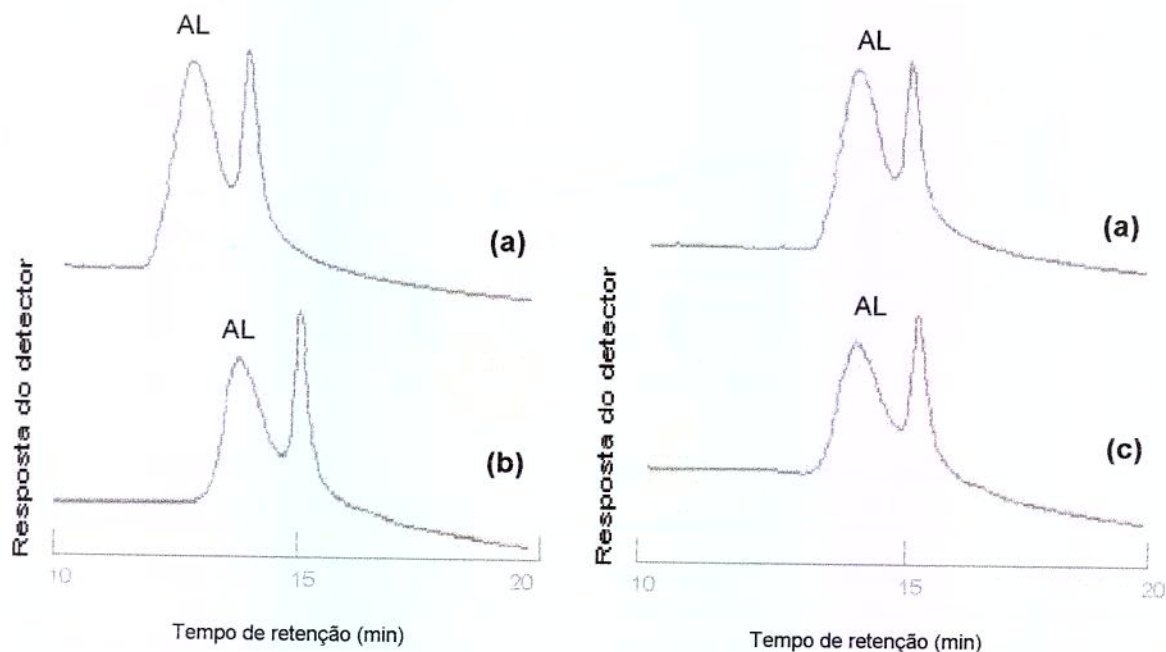


Figura 46 – Cromatogramas do controle abiótico (a) e das amostras do meio de cultivo das linhagens 1040 (b) e 984 (c) crescidas em ácido lignosulfônico (AL), 30 dias, sob condição microaeróbia.

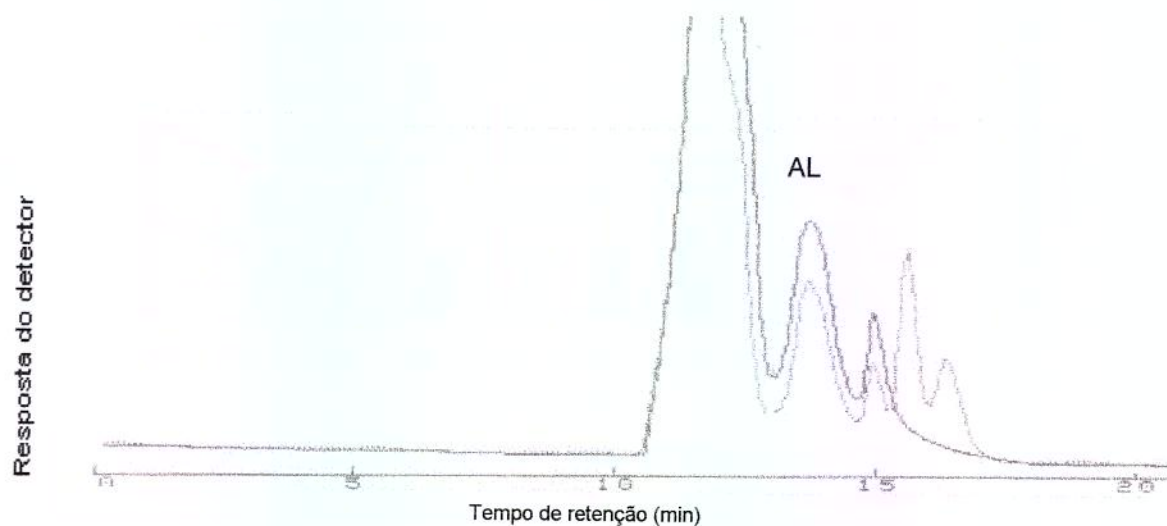


Figura 47 – Cromatogramas do controle abiótico (linha contínua) e da amostra do meio de cultivo da linhagem 20 (linha tracejada) crescidas em ácido lignosulfônico (AL), 30 dias, sob condição anaeróbia.

5.4.8. Ácido Tânico

De acordo com os as Figuras 48 e 49, as linhagens 801 e Q10 apresentaram as maiores degradações em microaerobiose (84,6 e 83,6%) e maiores valores de LiP e MnP. Embora H2 tenha apresentado o maior valor de atividade de MnP em anaerobiose, não foi verificado a degradação do AT por esta linhagem.

Pôde-se relacionar ainda maiores valores de lacase e de peroxidase com maiores degradações em microaerobiose. Embora tenha sido detectado atividade de lacase em condição anaeróbia para algumas linhagens, não foi observado degradação do ácido tânico, com exceção da linhagem 710 (2%).

As linhagens que apresentaram maiores crescimentos em ácido tânico também apresentaram melhores níveis de degradação desta fonte de carbono.

A degradação do ácido tânico por *Phanerochaete chrysosporium* (fungo basidiomiceto de degradação branca) após 24 horas foi de 65% pela ação de peroxidases, sob condição de oxigenação (GNANAMANI *et al.*, 2001). Outros resultados descritos por FALCONI (1998), demonstraram que os fungos não-basidiomicetos apresentam grande potencial à biodegradação deste composto na natureza. Em cultura estacionária, utilizando AT na concentração de 0,5%, foram obtidos valores de degradação de 71,4% (3 dias) e 72,8% (7 dias). Os dados de literatura são semelhantes aos apresentados pelas melhores linhagens estudadas neste trabalho, porém, após 30 dias de cultivo em microaerobiose.

De acordo com SAXENA (1995), o ácido tânico geralmente é inibidor do crescimento microbiano e pode inativar as enzimas responsáveis pela degradação. As linhagens estudadas neste trabalho foram capazes de utilizá-lo como fonte de carbono em microaerobiose, não havendo efeito inibitório para as enzimas neste sistema.

Atividade das enzimas ligninolíticas e degradação do ácido tânico

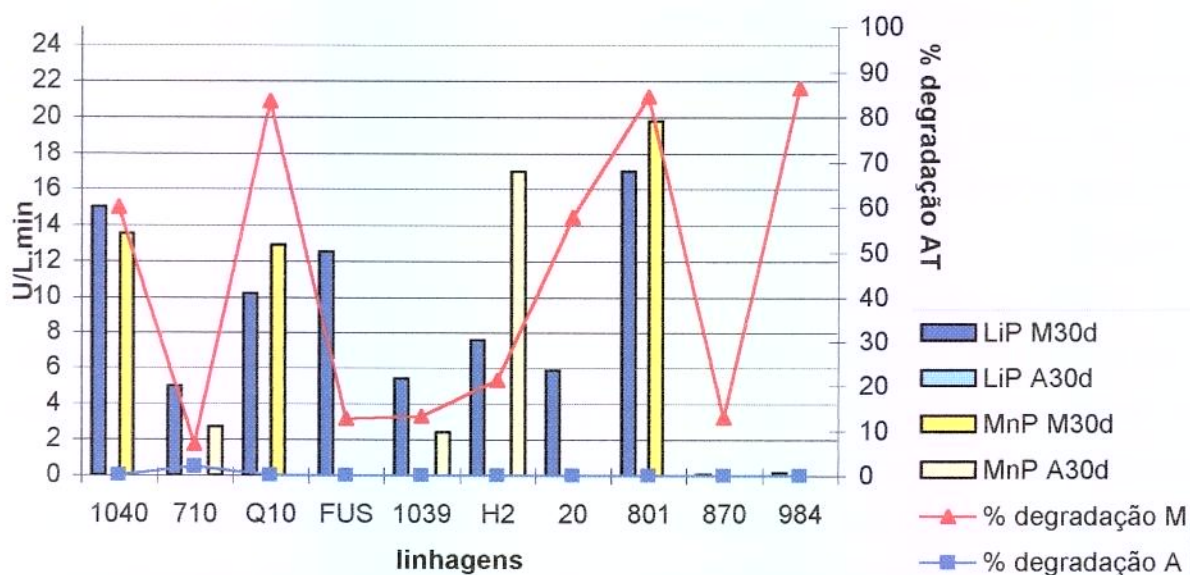


Figura 48 – Atividades de Lignina-peroxidase (LiP) e Manganês-peroxidase (MnP) produzidas pelas linhagens cultivadas em ácido tânico (AT) sob condições microaeróbia (M) e anaeróbia (A) em 30 dias de cultivo (30d); e porcentagem de degradação pelas linhagens sob as mesmas condições.

Atividade das enzimas ligninolíticas e degradação do ácido tânico

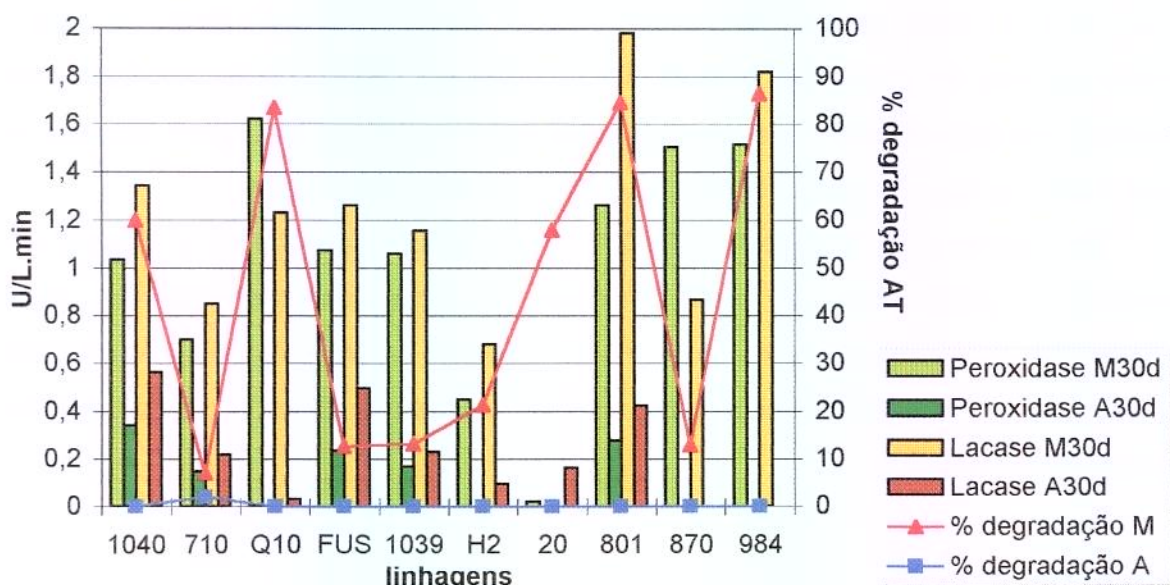


Figura 49 – Atividades de peroxidase e lacase produzidas pelas linhagens cultivadas em ácido tânico (AT) sob condições microaeróbia (M) e anaeróbia (A) em 30 dias de cultivo (30d); e porcentagem de degradação pelas linhagens sob as mesmas condições.

As figuras 50 e 51 ilustram as melhores degradações de ácido tânico em condição microaeróbia pelas linhagens 810 e Q10, respectivamente.

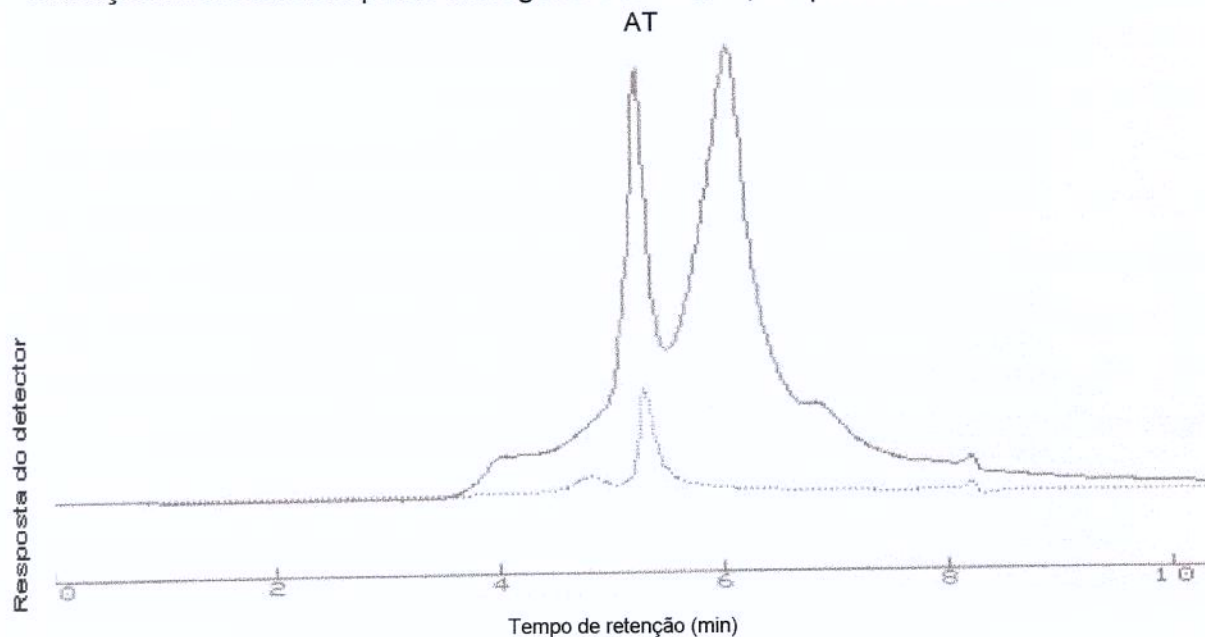


Figura 50 – Cromatograma das amostras contendo ácido tânico (AT) extraído do controle abiótico (linha contínua) e extraído do meio de cultivo da linhagem 801 (linha tracejada), 30 dias, sob condição microaeróbia.

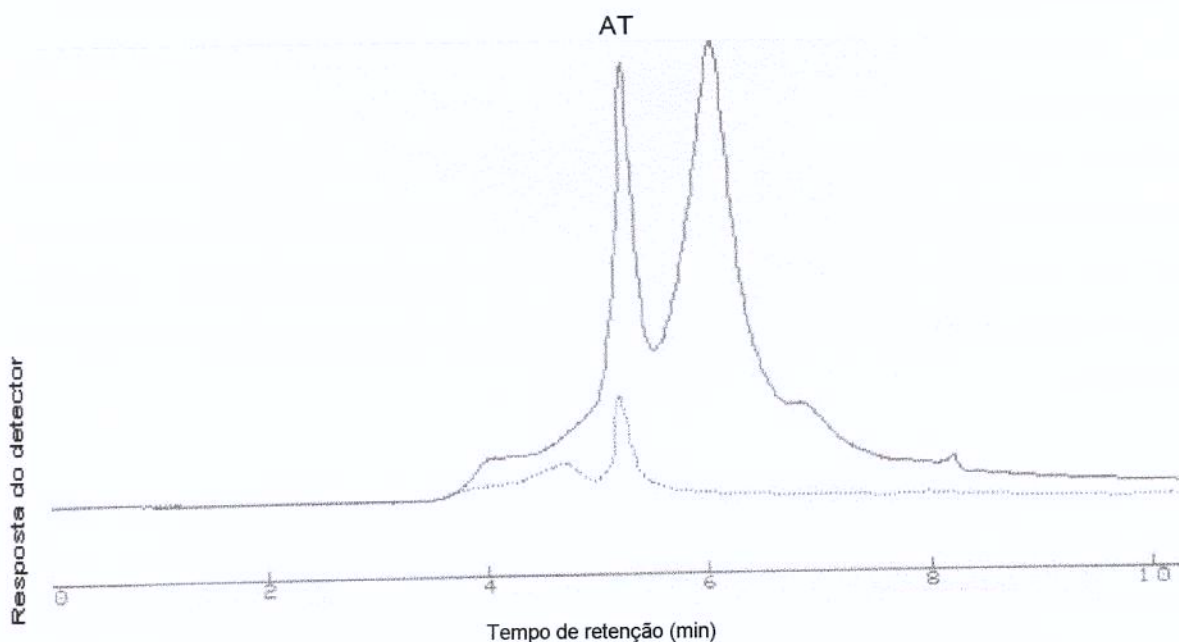


Figura 51 - Cromatograma das amostras contendo ácido tânico (AT) extraído do controle abiótico (linha contínua) e extraído do meio de cultivo da linhagem Q10 (linha tracejada), 30 dias, sob condição microaeróbia.

De acordo com os experimentos enzimáticos em condição anaeróbia, faixas semelhantes de valores das enzimas ligninolíticas foram verificadas, comparadas à condição microaeróbia (30 dias de cultivo), exceto para a enzima MnP, cujos valores de atividade foram maiores em microaerobiose.

A maioria das linhagens crescidas em HAPs sob condição anaeróbia não apresentou atividades de LiP e MnP, sendo a enzima tirosinase mais presente na maioria das linhagens crescidas em HAPs de maiores pesos moleculares, seguido de atividades de peroxidase e de lacase. Em ácido lignosulfônico, a maioria das linhagens apresentou atividade de LiP; e em ácido tânico como fonte de carbono, houve produção de lacase e outras peroxidases pela maioria das linhagens.

Dentre os HAPs, decaciclono (10 anéis) e perileno (5 anéis) foram os mais degradados pelas linhagens selecionadas (faixas de degradações de 20-40% e 11-40%, respectivamente), em relação aos HAPs de 4 a 10 anéis aromáticos. Naftaleno (2 anéis) apresentou melhor degradação que fenantreno (3 anéis); sendo o mesmo verificado para ácido lignosulfônico com relação ao ácido tânico (degradação apresentada apenas pela linhagem 710 – 2%).

Para a condição anaeróbia, não se verificou grande diferença da taxa de degradações entre os HAPs de baixa, média e alta massas molares, as quais variaram de 1 a 35%. Todas as linhagens apresentaram degradações de ácido lignosulfônico (6 a 33%). Pelos resultados de degradação verificados, observou-se que em condição microaeróbia, os HAPs, AL e AT apresentaram melhores degradações pelas linhagens selecionadas, quando comparadas com o sistema anaeróbio.

É importante ressaltar ainda que algumas das linhagens, as quais apresentaram maiores degradações dos HAPs em anaerobiose, não apresentaram enzimas ligninolíticas ou mostraram valores muito baixos destas. Portanto, estas enzimas talvez não sejam as principais envolvidas nos maiores níveis de degradação dos HAPs em condição microaeróbia (para a linhagem H2 em naftaleno e perileno; para a linhagem 984 em fenantreno, perileno e decaciclono), e em condição anaeróbia (para a linhagem Q10 em naftaleno e

decaciclono; para a linhagem FUS em fenantreno; para H2 em naftaleno, perileno e naftol [2,3-a] pireno). Neste caso, outras enzimas podem ter sido produzidas e ativadas nestas condições de cultivo, sendo responsáveis pela transformação e degradação dos HAPs por estes fungos.

Pode-se pensar ainda na produção de enzimas ligninolíticas como iniciadoras da degradação dos demais fungos, sendo ativadas inicialmente e anteriores ao período de 30 e 40 dias, ocorrendo posteriormente ativações de outras enzimas mais específicas para estas condições de cultivo. Segundo EGGEN (1999), os fungos produzem diferentes enzimas dependendo das suas características genéticas e das condições de cultivo a eles impostas.

De acordo com SUTHERLAND (1992), os fungos não utilizam os HAPs como única fonte de carbono e energia, possuindo a capacidade apenas de transformá-los cometabolicamente, bem como os HAPs de altas massas molares (MÜNCNEROVÁ & AUGUSTIN, 1994). Porém, neste trabalho, os fungos estudados utilizaram os HAPs como única fonte de carbono e energia e apresentaram degradações pra todos eles, mesmo sob condições microaeróbia e anaeróbia, porém, não houve mineralização de nenhuma fonte de carbono. Segundo HARWOOD e colaboradores (1999), nenhum organismo eucarioto é capaz de metabolizar compostos aromáticos na ausência de oxigênio.

A total degradação de HAPs sob condição anaeróbia foi verificada para naftaleno, antraceno, fenantreno e pireno apenas por bactérias (McNALLY *et al.*, 1998). Segundo HENDER & FUNCHS (1997), naftaleno e fenantreno são os únicos HAPs degradados em condição anaeróbia por bactérias; todos os outros compostos policíclicos de alta massa molar são degradados apenas em ambiente aeróbio (EGGEN, 1999). Porém, outros dados de literatura (JOHNSON & GHOSH, 1998; McRAE & HALL, 1998; McNALLY *et al.*, 1998) relatam que HAPs mais complexos podem sofrer biotransformação sob condição anaeróbia.

A degradação de poluentes xenobióticos sob condições microaeróbia e anaeróbia por fungos pode ser uma estratégia útil de biorremediação *ex-situ* dos sedimentos que necessitam serem reintroduzidos no ambiente, pois, tais condições dispensam custos de energia para a introdução de oxigênio e manutenção da agitação adequada para processo aeróbio. Para a biorremediação dos solos nestes ambientes, é interessante a mineralização dos HAPs por fungos isolados ou pela ação destes na microbiota indígena, com produção extracelular de enzimas para este fim.

Os resultados de degradação de HAP com diferentes massas molares e outros compostos orgânicos recalcitrantes, utilizados como única fonte de carbono por fungos sob condições de baixa oxigenação e anóxicas, presentes neste trabalho, foram surpreendentes e de grande importância para a complementação de dados na literatura em relação à potencialidade fúngica na degradação de compostos xenobióticos poliaromáticos nestas condições atmosféricas, cujos ambientes são sedimentos de mares, lagos, rios, camadas profundas de solo ou solos alagados, lençóis subterrâneos e nos mangues.

6. CONCLUSÕES

Pelos resultados apresentados e analisados, pôde-se concluir que, na condição microaeróbia:

- As linhagens apresentaram crescimentos em todas as fontes de carbono durante o período de cultivo e algumas puderam ser selecionadas de acordo com os melhores crescimentos na maioria das fontes de carbono;
- Todas as linhagens foram capazes de produzir enzimas ligninolíticas, porém, para algumas linhagens estas foram produzidas em níveis mínimos, não sendo as principais enzimas produzidas para a degradação dos HAPs, AL e AT havendo, possivelmente, a atuação de outras enzimas para esta condição de cultivo, uma vez que as maiores degradações ocorreram com baixo ou ausente níveis de atividade de enzimas ligninolíticas;
- Todas as linhagens foram capazes de produzir biosurfactantes, sugerindo solubilização da fonte de carbono para disponibilizá-la, favorecendo o crescimento dos fungos;
- As melhores degradação foram apresentados para HAPs de maiores massas molares, destacando-se as linhagens 984 (*Aspergillus* sp), 1040 (*Verticillum* sp), Q10 (*Trichocladium canadensis*) e 710 (*Achremonium* sp).

Em relação às linhagens selecionadas no crescimento anaeróbio:

- Quatro linhagens apresentaram melhores crescimentos em anaerobiose: FUS (*Fusarium oxysporum*), H2 (basidiomiceto), 984 (*Aspergillus* sp) e 1039 (não-identificada);
- Todas as linhagens apresentaram atividades de enzimas ligninolíticas, porém, LiP e MnP foram as menos expressivas para estes fungos em HAPs;
- A linhagem 984 (*Aspergillus* sp) destacou-se como produtora de biosurfactantes na maioria dos HAPs utilizados como fontes de carbono;
- Verificaram-se degradações para todas as fontes de carbono estudadas pelas linhagens selecionadas, exceto ácido tânico, tendo Q10 (*Trichocladium canadensis*), H2 (basidiomiceto) e 710 (*Achremonium* sp) apresentado maiores degradações para a maioria das fontes de carbono nesta condição.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

As linhagens fúngicas utilizadas neste trabalho, capazes de crescerem em HAPs, ácido lignosulfônico e ácido tânico sob condições microaeróbia e anaeróbia, e ainda apresentar atividades de enzimas ligninolíticas e produção de biosurfactantes, podem vir a serem biorremediadores em potencial de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em ambientes com baixa oxigenação como os sedimentos de rios e lagos, solos alagados, lençóis freáticos e fundo de mares e oceanos.

Estudos posteriores de degradação de HAPs em consórcio com microbiota natural do local a ser tratado, utilizando HAPs em experimentos individuais e em misturas nos microcosmos com condições anóxicas e de baixa oxigenação serão de grande importância para a verificação da potencialidade das linhagens selecionadas. O estudo ainda das vantagens e desvantagens de cometabolismos para a eficiência da degradação nestes ambientes em menos tempo também é de grande importância.

O monitoramento por técnicas moleculares para a confirmação da presença das linhagens no processo de degradação, bem como da ativação ou não das enzimas responsáveis pela biotransformação dos contaminantes geram dados interessantes para o estudo da biorremediação de locais atípicos pouco estudados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, M.D. & IRVINE R.L. Characterization of reactions catalyzed by Manganese Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysic**, v.276, n.2, pp.405-414. 1990.
- AITKEN, M.D. & LOGAN, B.E. Degradation of pentachlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown in ammonium lignosulphonate media. **Biodegradation**, v.7, n.3, pp.175-182. 1996.
- ALBERTI, B.N. & KLIBANOVI, A.M. Enzymatic removal of dissolved aromatics from industrial aqueous effluents. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v.3, pp.33-379. 1981.
- ALDRICH. Handbook of Fine Chemicals and Laboratory Equipment. Catálogo 2000-2001.
- AMERICAM SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. Standard Practice for Determining Resistance of synthetic Polymeric Materials to fungi. G21-90, 1990.
- ANDERSSON, B.E.; WELINDER, L.; OLSSON, P.A.; OLSSON, S. & HENRYSSON, T. Growth of inoculated white-rot fungi and their interactions with the bacterial community in soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, as measured by phospholipid fatty acids. **Bioresources Technology**, v.73, pp.29-36. 2000.
- ANTONOPOULOS, V.T.; ROB, A.; BALL, A.S. & WILSON, M.T. Dechlorination of chlorophenols using extracellular peroxidases produced by *Streptomyces albus* ATCC 3005. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, pp. 62-69. 2001.
- BALLY, L.; THOMAS-BAUZON, P.; HEULIN, T.; BALANDREAU, J.; RICHARD, C. & DE LEY, J. Determination of the most frequent n-2-fixing bacteria in a rice rhizosphere. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, pp.881-887. 1983.
- BANCI, L.; CIOFI-BAFFONI, S. & TIEN, M. Lignin and Mn Peroxidase-catalyzed oxidation of phenolic lignin oligomers. **Biochemistry**, v.38, p.3205. 1999.

- BARR, D.P. & AUST, S.D. Critical review: Mechanisms white-rot fungi use to degrade pollutants. **Environmental Science Technology**, v.28, pp.78-87. 1994a.
- BARR, D.P. & AUST, S.D. Pollutant degradation by White-rot fungi. **Reviews Environmental and Contaminant Toxicology**, v.138, pp.49-72. 1994b.
- BARTLE, K.D. Analysis and occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in food. *In*: COLIN, C. & PURCHASE, R. (Ed.). **Food Contaminants: sources and Surveillance**, chapter 3, p.41-60. 1991.
- BENDING, G.D. & READ, D.J. Effects of the soluble polyphenol tannic acid on the activities of ericoid and ectomycorrhizal fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, v.28, n.12, pp.1595-1602. 1996a.
- BENDING, G.D. & READ, D.J. Nitrogen mobilization from protein-polyphenol complex by ericoid and ectomycorrhizal fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, v.28, n.12, pp.1603-1612. 1996b.
- BEZALEL, L.; HADAR, Y.; FU, P.P.; FREEMAN, J.P. & CERNIGLIA, C.E. Initial degradation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene and dibenzothiophene by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, pp.2554-2559. 1996.
- BEZALEL, L.; HADAR, Y. & CERNIGLIA, C.E. Enzymatic mechanism involved in phenanthrene degradation by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, pp.2495-2501. 1997.
- BHAN, T.K.; MAKAR, H.P.S. & SINGH, B. Preliminary studies on tannin degradation by *Aspergillus niger* van Tieghem MTCC 2425. **Letters in Applied Microbiology**, v.25, n.1, pp.22-23. 1997.
- BIDAUD, C. & TRAN-MINH, C. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation in the soil of a former gasworks site: selection and study of PAHs-degrading microorganisms. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.5, 41-421. 1998.

- BLACK, J.A.; BIRGE, W.J.; WESTERMAN, A.G.; FRANCIS, P.C. Comparative aquatic toxicology of aromatic hydrocarbons. **Fundamental and Applied Toxicology**, v.3, 353-358. 1983.
- BLANCHETTE, R.A. Delignification by wood-decay fungi. **Annual Reviews of Phytopathology**, v.29, pp.381-398. 1991.
- BOLLAG, J-M. Decontaminating soil with enzymes. **Environmental Science and Technology**, v.26, n.10, pp.1876-1881. 1992.
- BOGAN, B.W. & LAMAR, R.T. One-electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, pp.2631-2635. 1995.
- BOONCHAN, S.; BRITZ, M.L. & STANLEY, G.A. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.3, pp.1007-1019. 2000.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresources and Technology**, v.74, pp. 63-67. 2000.
- BOUDET, A-M. Lignins and lignification: selected issues. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.38, n.1-2, pp.81-96. 2000.
- BRODERICK, L.S. & COONEY, J.J. Emulsification of Hydrocarbons by Bacteria from Freshwater. **Development of Industrial Microbiology**, v.23, n.39, pp.425-434. 1981.
- BURNS, K.A.; CIDO, S.; SWANNELL, R.J.P. & DUKE, N.C. Assessing the petroleum hydrocarbon degradation potential of endogenous tropical marine wetland micro-organisms: Flask experiments. **Mangroves and Salt Marshes**, v.3, pp.67-83. 1999.

- BUSWELL, J.A. & ODIER, E. Lignin Biodegradation. **CRC Critical Reviews of Biotechnology**, v.6, pp.1-60. 1987.
- CAI, D. & TIEN, M. Lignin-degrading peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biotechnology**, v.30, pp.79-90. 1993.
- CALL, H.P. & MÜCKE, I. The laccase-mediator system (LMS) – a new concept. In: SREBOTNIK, E. & MESSNER, K. **Biotechnology in the Pulp and Paper Industry** (ed.). Viena, Austria: Facultas-Universitätsverlag. 1995. pp.27-32.
- CAMARERO, S.; RUIZ-DUEÑAS, F.J.; SARKAR, S.; MARTÍNEZ, M.J. & MARTÍNEZ, A.T. The cloning of a new Peroxidase found in lignocellulose cultures of *Pleurotus eryngii* and sequence comparison with other fungal peroxidases. **FEMS Microbiology Letters**, v.191, pp.37-43. 2000.
- CAMARGO, M.C.R. Avaliação da ingestão de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos através da dieta. Campinas, 2000. 267p. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- CAMERON, M.D.; TIMOFEEVSKI, S. & AUST, S.D. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.54, pp.751-758. 2000.
- CANET, R.; BIRNSTINGL, J.G.; MALCOLM, D.G.; LOPEZ-REAL, J.M. & BECK, A.J. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. **Bioresources and Technology**, v.76, pp.13-117. 2001.
- CANET, R.; LOPEZ-REAL, J.M. & BECK, A.J. Overview of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by white-rot fungi. **Land Contamination Reclam.**, v.7, pp.191-197. 1999.

- CARVALHO, D.; MAECHI, D.D. & DURRANT, L.R. Biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms. *In: Simpósio Nacional de Fermentações*. São Carlos, Depto de Química – UFSCar, v.11, pp.686-681. 1996.
- CARVALHO, D.; MAECHI, D.D. & DURRANT, L.R. Surface-active emulsifying agents produced by microorganisms isolated from oil-contaminated soil. *In: Conference Proceedings - Environmental strategies for the 21st Century*. (ed.). Singapore: Proceeding National University. 1998. pp.564-569.
- CASELLAS, M.; GRIFOLL, M.; ABATÉ, J. & SOLANAS, A.M. Isolation of a 9-fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluoreno by a consortium. **Canadian Journal of Microbiology**, v.44, pp.73-742. 1998.
- CERNIGLIA, C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biodegradation**, v.3, pp.351-368. 1992.
- CERNIGLIA, C.E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. **Journal of Industry Microbiology and Biotechnology**, v.19, pp.324-333. 1997.
- CERNIGLIA, C.E. & HEITKAMP, A. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the aquatic environment. *In: Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*. (ed.). Boca Ratón: U. Varanasi, CRC Press. 1989. pp.41-68.
- CHANG, B.V.; YEH, L.N. & YUAN, S.Y. Effect of a dichlorophenol-adapted consortium on the dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol and pentachlorophenol in soil. **Chemosphere**, v.33, pp.303-311. 1996.
- CHEN, W.; OHMIYA, K.; SHIMIZU, S. & KAWAKAMI, H. Anaerobic degradation of dehydrodiisoeugenol by rumen bacteria. **Journal of Fermentation Technology**, v.65, pp.221-224. 1987.

- CHEN , W.; OHMIYA, K.; SHIMIZU, S. & KAWAKAMI, H. Degradation of dehydrodivanillin by anaerobic bacteria from cow rumen fluid. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49, pp.211-216. 1985.
- CHEN, B.H.; WANG, C.Y. & CHIU, C.P. Evaluation of analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in meat products by liquid chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.44, n.8, pp.2244-2251. 1996.
- CHU, A.; MAVINIC, D.S.; RAMEY, W.D. & KELLY, H.G. A Biochemical model describing volatile fatty acid metabolism in thermophilic aerobic digestion of wastewater sludge. **Watters Researches.**, v.30, n.8, pp.1759-1770. 1996.
- CLEMENTE, A.R. Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos por fungos ligninolíticos e sua aplicação na biorremediação de solos contaminados. Campinas, 2002. 221p. Boneco de tese (Doutoramento em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- CLEMENTE, A. R. Seleção de microrganismos ligninolíticos, estudo do sistema enzimático produzido e sua relação na degradação de compostos xenobióticos. Lorena, 1997. 137p. Tese de Mestrado em Biotecnologia Industrial – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, FAENQUIL.
- CLEMENTE, A .R.; ANAZAWA, T.A . & DURRANT, L.R. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, pp.255-261. 2001.
- COATES, J.D. & ANDERSON, R.T. Emerging techniques for anaerobic bioremediation of contaminated environments **TIBTECH**, v.18, pp.408-412. 2000.
- COATES, J.D.; WOODWARD, J.; ALLEN, J.; PHILP, P. & LOVLEY, D.R. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine in harbor sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.9,, pp.3589-3593. 1997.

- COLLINS, P.; KOTTERMAN, M.J.J. & FIELD, J.A. Oxidation of anthracene and benzo(a)pyrene by laccase from *Trametes versicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, pp.4563-4567. 1996.
- COLOMBO J.C.; CABELLO,M. & ARAMBARRI, A.M. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfect and ligninolytic fungi. **Environmental Pollution**, v.94, n.3, pp.355-362. 1996.
- COOPER, D. & GOLDENBERG, B.G. Surface-Active Agents from two *Bacillus* spp. **Applied Environmental Microbiology**, v.53, n.2, pp. 224-229. 1987.
- DE JONG, E.; FIELD, J.A. & DE BONT, J.A.M. Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v.13, pp.153-188. 1994.
- DESAI, J.D. & BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiological and Molecular Biology Reviews**, v.61, n.1, pp.47-64. 1997.
- DEZOTTI, M.; INNOCENTINI-MEI, L.H. & DURÁN, N. Sílica immobilized enzyme catalyzed removal of chlorolignin from eucalyptus kraft effluent. **Journal of Biotechnology**, v.43, pp.161. 1995.
- DIX, N.J. & WEBSTER, J. **Fungal Ecology**. (ed.). Cambridge: Chapman & Hall. 1995, p.280.
- DURÁN, N. & ESPOSITO, E. Potential application of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v.28, pp.83-99. 2000.
- DURRANT, L.R. Ethanol production from cellulose by two lignocellulolytic soil fungi. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.57, n.8, pp. 399-406. 1996.
- DURRANT, L.R.; CANALE-PAROLA, E. & LESCHINE, S.B. In: Shimada, k.; Ohmiya, k.; Kobayashi, Y.; Hoshino, S.; Sakka, K. and Karita, S.(Ed.). **Genetics, Biochemistry**

- and Ecology of Linnocellulose Degradation.** Uni Publishers Co., Ltd. 1994. p.506-515.
- DURRANT, L.R.; CANALE-PAROLA, E. & LESCHINE, S.B. In: Collins, H.P.; Robertson, G.P. and Klug, M.J. (Ed.) **The Significance and Regulation of Soil Biodiversity.** Netherland: Kluwer Academic Publisher.1995. p.161-167.
- EGGEN, T. Application of fungal substrate from commercial mushroom production – *Pleurotus ostreatus* – for bioremediation of creosote contaminated soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.44, pp.117-126. 1999.
- EGGERT, C.; TEMP, U. & ERIKSON, K.E. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. **Applied and Environmental Technology**, v.62, pp.1151-1158. 1996.
- EICHLEROVÁ, I.; HOMOLKA, L.; NERUD, F.; ZADRAZIL, F.; BALDRIAN, P. & GABRIEL, J. Screening of *Pleurotus ostreatus* isolated for their ligninolytic properties during cultivation on natural substrates. **Biodegradation**, v.11, pp.279-287. 2000.
- EVANS, C.S.; DUTTON, M.V.; GUILLÉN, F. & VENESS, R. Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, v.13, pp.235-240. 1994.
- FALCONI, F.A. Bioconversão de compostos fenólicos por fungos ligninolíticos. Campinas, 1998. 108p. Tese de Mestrado em Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- FERNANDEZ, M.J.; GARCIA, C.; GARCIA-VILLANOVA, R.J. & GOMEZ, J.A . Evaluation of liquid-liquid extraction and liquid-solid extraction with a new sorbent for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in raw and fishined drinking waters. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.44, pp.1785-1789. 1996.

- FERRER, I.; DEZOTTI, M. & DURÁN, N. Decolorization of Kraft effluent by free and immobilized lignin peroxidase and horseradish peroxidase. **Biotechnology Letters**, v.13, pp.577. 1991.
- FIELD; J.A.; STAMS A.J.M.; KATO, M. & SCHRAA, G. Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. **Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v.67, n.1, pp.47-77. 1995.
- GAATHON, A.; GROSS, Z. & ROZHANSKI, M. Propyl gallate: enzymatic synthesis in a reverse micelle system. **Enzyme and Microbiology Technology**, v.11, pp.604-609. 1989.
- GALLI, E. The role of microorganisms in the environment decontamination. *In*: RENZONI, A.; MOLTEI, N.; LARI, L.; FOSSI, M.C. **Contaminants in the Environment. A multidisciplinary Assessment of Risks to man and other microorganisms**.(ed.). Florida: Lewis Publishers. 1994. chapter 25. pp.235-246.
- GNANAMANI, A.; SEKARAN, G. & BABU, M. Removal of tannin from cross-linked and open chain polymeric tannin substrates using heme preoxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.24, n.4, pp. 211-217. 2001.
- GOCHT, T.; MOLDENHAUER, K-M. & PÜTTMANN, W. Historical record of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and heavy metals in floodplain sediments from the Rhine River (Hessisches Ried, Germany). **Applied Geochemistry**, v.16, pp.1707-1721. 2001.
- GOLD, M.H. & ALIC, M. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Microbiology Reviews**, v. 57, pp.605-622. 1993.
- GOLD, M.H.; WARRISHI, H. & VALLI, K. Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **ACS Symp. Ser.**, v.389, pp.127-140. 1989.

- GOODWIN, D.C.; AUST, S.D. & GROVER, T.A. Evidence for veratryl alcohol as a redox mediator in lignin peroxidase-catalyzed oxidation. **Biochemistry**, v. 34, pp.5060-5065. 1995.
- GRISHCHENKOV, V.G.; TOWNSEND, R.T.; MCDONALD, T.J.; AUTENRIETH, R.L.; BONER, J.S. & BORONIN, A.M. Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. **Process of Biochemistry**, v.35, pp.889-896. 2000.
- GUTIÉRREZ, A.; DEL RÍO, J.C.; MARTÍNEZ, M.J. & MARTÍNEZ, A.T. Fungal degradation of lipophilic extractives in *Eucalyptus globulus* wood. **Applied Environment Microbiology**, v.65, pp.1367-1371. 1999.
- HÄGGBLOOM, M.M. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. **FEMS Microbiology Reviews**, v.103, pp.29-72. 1992.
- HAMMEL, K.E.; KALYANARAMAN, B. & KIRK, T.K. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dizenbo[p]-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. **Journal of Biology and Chemistry**, v.261, pp.16948-16952. 1986.
- HARAYAMA, S. Polycyclic aromatic hydrocarbons bioremediation desing. **Currents Opinion in Biotechnology**, v.8, n.3, pp.268-273. 1997.
- HARWOOD, C.S.; BURCHHARDT, G.; HERRMANN, H. & FUCHS, G. Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. **FEMS Microbiology Reviews**, v.22, pp.439-458. 1999.
- HATTAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected whit-rot fungi: Production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, pp. 125-135. 1994.
- HEIDER, J. & FUCHS, G. Microbial anaerobic aromatic metabolism. **Anaerobe**, v.3, pp.1-22. 1997.

- HEIDER, J.; SPORMANN, A.M.; BELLER, H.R. & WIDDEL, F. Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. **FEMS Microbiology Reviews**, v.22, pp.459-473. 1999.
- HENRIKSSON, G; JOHANSSON, G. & PETTERSSON, G. A critical review of cellobiose dehydrogenase. **Journal of Biotechnology**, v.78, p.93-113. 2000.
- HERNES, P.J.; BENNER, R.; COWIE, G.L. GOÑI, M.A. BERGAMASCHI, B.A. & HEDGES, J.I. Tannin diagenesis in mangrove leaves from a tropical estuary: a novel molecular approach. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.65, n.18, pp.3109-3122. 2001.
- HOWARD, P.J.A.; HOWARD, D.M. & LOWE, L.E. Effect of tree species and physico-chemical conditions of the nature of soil organic. Matter. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, pp.285-297. 1998.
- INGOLD, G. & HUDSON, H.J. **The Biology of Fungi** (6ed.). New York: Chapman & Hall. 1993. 224p.
- IVSHINA, I.B.; KUYUKINA, M.S.; PHILP, J.C. & CHRISTOFI, N. Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* ssp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.14, pp.711-717. 1998.
- JOHNSON, K. & GHOSH, S. Feasibility of anaerobic biodegradation of PAHs in dredged river sediments **Watters Science and Technology**, v.38, n.7, pp.41-48. 1998.
- KAJIKAWA, H.; KUDO, H.; KONDO, T.; JODAI, K.; HONDA, Y.; KUWAHARA, M. & WATANABE, T. Degradation of benzyl ether bonds of lignin by ruminal microbes. **FEMS Microbiology Letters**, v.187, pp.15-20. 2000.
- KANEKO, R.; IIMORI, T.; MIYAWAKI, S.; MASHIDA, M. & MURAKAMI, K. Biobleaching with Manganese-Peroxidase purified from the pulp bleaching fungus SKB-1152. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.59, pp.1584-1585. 1995.

- KARAN, J. & NICELL, J.A. Potential applications of enzymes in waste treatment. **Journal of Chemistry, Technology and Biotechnology**, v.69, p.141. 1997.
- KÄSTNER, M. & MAHRO, B. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil affected by the organic matrix of compost. **Applied and Environmental Microbiology**, v.44, pp.757-760. 1996.
- KATAYAMA, A. & MATSUMURA, F. Photochemically enhanced microbial degradation of environmental pollutants. **Environmental Science and Technology**, v.25, pp.1329-1333. 1991.
- KELLEY, R.L. & REDDY, C.A. Identification of glucose-oxidase activity as the primary source of hydrogen-peroxide production in ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Microbiology**, v.144, pp.248-253. 1986.
- KERSTEN, P.J.; TIEN, M.; KALYANARAMAN, B. & KIRK, T.K. Involvement of a new enzyme glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Bacteriology**, v.169, pp.2195-2200. 1985.
- KHAN, N.S.; AHMAD, A. & HADI, S.M. Anti-oxidant, pro-oxidant properties of tannic acid and its binding to DNA. **Chemico-Biological Interaction**, v.125, pp.177-189. 2000.
- KIEHLMANN, E.; PINTO, L. & MOORE, M. The biotransformation of chrysene to trans-1,2-dihydroxy-1,2-dihydrochrysene by filamentous fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, pp.604-608. 1996.
- KIM, G.B.; MARUYA, K.A.; LEE, R.F.; LEE, J.H.; KOH, C.H. & TANABE, S. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from Kyeonggi Bay, Korea. **Marine Pollution Bulletin**, v.38, pp.7-15. 1999.
- KIRK, T.K. & FARRELL, R.L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. **Annual Rev. Microbiology**, v.41, pp.465-505. 1987.

- KORNMÜLLER, A. & WIESMANN, U. Continuous ozonation of polycyclic aromatic hydrocarbons in oil/water-emulsions and biodegradation of oxidation products. **Water Science and Technology**, v.40, n.4-5, pp.107-114. 1999.
- KROL, E.S. & BOLTON, J. L. Oxidation of 4-alkylphenols and catechols by tyrosinase: ortho-substituents alter the mechanism of quinoid formation. **Chemico-Biological Interaction**, v.104, pp.11-27. 1997.
- KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A. & GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxydases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v.169, pp.247-250. 1984.
- KUYUKINA, M.S.; IVSHINA, I.B.; PHILP, J.C.;CHRISTOFI, N.; DUNBAR, S.A. & RITCHKOVA, M.A. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants usinf methyl tertiary-butyl ether extraction. **Journal of Microbiological Methods**, v.46, pp.149-156. 2001.
- LAMAR, R.T. The role of fungal lignin - degrading enzymes in xenobiotic degradation. **Current Opinion in Biotechnology**, v.3, pp.261-266. 1992.
- LAMAR, R.T.; EVANS, J.N. & GLASER, J.A. Solid-phase treatment of a pentachlorophenol contaminated soil using lignin degrading fungi. **Environmental Science and Technology**, v.27, pp.2566-2571. 1993.
- LANG, S. & WAGNER, F. Structure and properties of biosurfactants. In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L. & GRAY, N.C.C. **Biosurfactants and Biotechnology**. (ed.). New York, Basel: Marcel Dekker, Inc. 1987. capto 1, p.342.
- LAUNEN, L.; PINTO, L.; WIEBE, C.KIEHLMANN, E. The oxidation of pyrene and benzo[a]pyrene by nonbasidiomycete soil fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, pp.477-488. 1995.

- LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v.56, pp. 1-24. 1997.
- LEE, Y.S. Qualitative evaluation of ligninolytic enzymes in xylariaceous fungi. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.10, n.4, pp.462-469. 2000.
- LIAO, W.L. & TSENG, D.H. Biotreatment of naphthalene by PAH-acclimated pure culture with white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Water Science and Technology**, v.34, n.10, pp.73-79. 1996.
- LODOVICI, M.; DOLARA, P.; CASALINI, C.; CIAPELLANO, S. & TESTOLINI, G. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon contamination in the italian food. Food additives and Contaminants, v.12, n.5, pp.703-713. 1995.
- MAJCHERCZYK, A. JOHANNES, C. & HÜTTERMAN, A. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by laccase of *Trametes versicolor*. **Enzyme Microbiology Technology**, v.22, pp.335-341. 1998.
- MARCOUX, J.; DEZIEL, E.; VILLEMUR, R.; LEPINE, F.; BISAILLON, J.G. & BEAUDET, R. Optimization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons degradation in a two-liquid-phase bioreactor. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, n.4, pp.655-662. 2000.
- MARTÍNEZ, M.J.; RUIZ-DUEÑAS, F.J.; GUILLÉN, F. & MARTÍNEZ, A.T. Purification and catalytic properties of two manganese-peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. **European Journal of Biochemistry**, v. 237, pp. 424-432. 1996.
- McNALLY, D.L.; MIHELICIC, J.R. & LUEKING, D.R. Biodegradation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and nitrate-reducing conditions. **Chemosphere**, v.38, n.6, pp.1313-1321. 1999.
- McNALLY, D.L.; MIHELICIC, J.R. & LUEKING, D.R. Biodegradation of three and four-ring polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and denitrifying conditions. **Environmental and Science Technology**, v.32, pp.2633-2639. 1998.

- McRAE, J.D. & HALL, K.J. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in marine sediment under denitrifying conditions. **Water Science and Technology**, v.38, n.11, pp.177-185. 1998.
- McSWEENEY, C.S.; DULIEU, A.; KATAYAMA, Y. & LOWRY, J.B. Solubilization of lignin by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix patriciarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.8, pp.2985-2989. 1994.
- McSWEENEY, C.S.; PALMER, B.; MCNEILL, D.M. & KRAUSE, D.O. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v.91, pp.83-93. 2001.
- MOREIRA, M.T.; FEIJOO, G.; SIERRA-ALVAREZ, R.; LEMA, J. & FIELD, J.A. Biobleaching of oxygen delignified Kraft pulp by several white-rot fungal strains. **Journal of Biotechnology**, v.53, pp.237-251. 1997.
- MORET, S. & CONTE, L.S. Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods. **Journal of Chromatography A**, v.882, n.1-2, pp.245-253. 2000.
- MOROHOSHI, N. Laccases of the ligninolytic fungus *Coriolus versicolor*. **ACS Symposium Series**. v.460, pp. 207-224. 1991.
- MÜNCNEROVÁ, D. & AUGUSTIN, J. Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. **Bioresource Technology**, v.48, pp.97-106. 1994.
- MURDIATI, T.B.; MSWEENEY, C.S. & LOWRY, J.B. Metabolism in sheep of gallic acid, tannic acid and hydrolysable tannin for *Terminalia oblongata*. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.43, pp.1307-1319. 1992.
- NELSON, K.E.; PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. & ZINDER, S. Isolation and characterization of an anaerobic ruminal bacterium capable of degrading hydrolysable tannins. **Applied Environmental Microbiology**, v.61, n.9, pp.3293-3298. 1995.

- NIELSON, A.H. The biodegradation of halogenated organic compounds **Archives of Microbiology**, v.154, pp.23-30. 1990.
- NISHIDA, A. & ERIKSSON, K.E. Formation, purification, and partial characterization of methanol oxidase, a H₂O₂ producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnological Applied in Biochemistry**, v.9, pp.325-338. 1987.
- NOLL, I.B. & TOLEDO, M.C.F. Determinación de Benzo(a)pireno en asados tipo churrasco en Brasil. **Información Tecnológica**, v.8, n.2, pp. 177-181. 1997.
- NOVOTNY, C.; ERBANOVA, P.; SASEK, V.; KUBATOVA, A.; CAJHTAML, T.; LANG, E. KRAHL, J. & ZADRAZIL, F. Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white-rot fungi. **Biodegradation**, v.10, n.3, pp.159-168. 1999.
- ODONERA, H. KITaura, K.; MITSUMORI, K.; YOSHIDA, J.; YASHUARA, K.; SHIMO, T.; TAKAHASHI, M. & HAIASHI, Y. Study of the carcinogenicity of tannic acid in the F344 rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.12, pp.1101-1106. 1994.
- PALMA, C.; MARTÍNEZ, A.T.; LEMA, J.M. & MARTÍNEZ, M.J. Different fungal manganese-oxidizing peroxidases: a comparison between *Bjerkandera sp.* and *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biotechnology**, v.77, pp.235-245. 2000.
- PAVARINA, E.C. Estudos dos Sistemas Celulolíticos e Fermentativos de Fungos Microaeróbios Facultativos. Campinas, 1997. 82p. Tese de Mestrado em Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- PAVARINA, E.C.; SETTE, L.D.; ANAZAWA, T.A. & DURRANT, L.R. Enzymes produced by soil fungi following microaerobic growth on lignocellulosic materials. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.82, pp.153-163. 1999.

- PAVARINA, E.C. & DURRANT, L.R. Biodegradation of lignocellulose by three soil fungi under different conditions of oxygenation. **International Biodeterioration & Biodegradation** (no Prelo): 2002.
- PERALTA-ZAMORA, P.; MOARES, S.G.; ESPOSITO, E.; ANTUNES, R.; REYES, J. & DURÁN, N. Decolorization of pulp Mill effluents with immobilized lignin and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Environmental Technology**, v.19, pp.521. 1998.
- PICKARD, M.A.; ROMAN, R.; TINOCO, R. & VAZQUEZ-DUHALT, R. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 laccase. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.9, pp.3805-3809. 1999.
- PIGNATELLO, J.J. & XING, B. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. **Environmental Science and Technology**, v.30, pp.1-11. 1996.
- POTTHAST, A.; ROSENAU, T.; CHEN, C.L. & GRATZL, J.S. A novel method for the conversion of benzyl alcohols to benzaldehydes by laccase-catalyzed oxidation. **Journal of Molecular Catalysis**, v.108, pp.5-9. 1996.
- POTTHAST, A.; ROSENAU, T.; CHEN, C.L. & GRATZL, J.S. Selective enzymatic oxidation of aromatic methyl groups to aldehydes. **Journal of Organic Chemistry**, v.60, pp.4320-4322. 1995.
- RAMSAY, M.A.; SWANNELL, R.P.J.; SHIPTON, W.A.; DUKE, N.C. & HILL, R.T. Effect of Bioremediation on the Microbial Community in Oiled Mangrove Sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v.41, n.7-12, pp.413-419. 2000.
- READING, N.S. & AUST, S.D. Engineering a disulfide bond in recombinant manganese-peroxidase results in increased thermostability. **Biotechnology Progress**, v. 16, pp. 326-333. 2000.

- REDDY, C.A. & D'SOUZA, T.M. Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.13, pp.137-152. 1994.
- RICHTER, H. & HOWARD, J.B. Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons and their growth to soot-a review of chemical reaction pathways. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.26, pp.565-608. 2000.
- ROCKNE, K.J. & STRAND, S.E. Anaerobic biodegradation of naphthalene, phenanthrene and biphenyl by a denitrifying enrichment culture. **Water Research**, v.35, n.1, pp.291-299. 2000.
- ROCKNE, K.J. & STRAND, S.E. Biodegradation of bicyclic and polycyclic aromatic hydrocarbons in anaerobic enrichments. **Environmental and Science Technology**, v.32, pp. 3962-3967. 1998.
- RODRÍGUEZ, A.; FALCÓN, M.A.; CARNICERO, A.; PERESTELO, F.; DE LA FUENTE, G. & TROJANOWSKI, J. Laccase activities of *Penicillium chrysogenum* in relation to lignin degradation. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v.45, pp.399-403. 1996.
- RODRIGUEZ, J.; FERRAZ, A.; NOGUEIRA, R.F.P.; FERRER, I.; ESPOSITO, E. & DURÁN, N. Lignin biodegradation by the ascomycete *Chrysosporium sitophilum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.62, p.233-237. 1997.
- ROMERO, M.C.; CAZAU, M.C.; GIORGIERI, S. & ARAMBARRI, A.M. Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream. **Environmental Pollution**, v.101, pp.355-359. 1998.
- ROUSE, J.D.; SABATINI, D.A.; SUFLITA, J.M. & HARWELL, J.H. **Abstract of papers of the American Chemical Society**, v.207, Part I, pp.152-ENVR. 1994.

- SANGLARD, D.; LEISOLA, M.S.A. & FIECHTER, A. Role of extracellular ligninases in biodegradation of benzo[a]pireno by *Phanerochaete chrysosporium*. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.8, pp.209-212. 1986.
- SAXENA, R.K.; SHARMILA, P. & SINGH, V.P. Microbial degradation of tannins. **Progress in Industrial Microbiology**, v.32, pp.259-270. 1995.
- SEABRA, P.N. Uso da Biorremediação em áreas impactadas pela Indústria de Petróleo. In: MELO, I.S.; SILVA, C.M.M.S.; SCRAMIN, S. & SPESSOTO, A. **Biodegradação**. Jaguariúna: EMBRAPA-meio ambiente. 2001. II Workshop sobre Biodegradação, p.41-59.
- SEMPLE, K.T.; REID, B.J. & FERMOR, T.R. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. **Environmental Pollution**, v.112, pp.269-283. 2001.
- SETTE, L.D. Estudo do sistema ligninolítico produzido por fungos sob diferentes condições de oxigenação. Campinas, 1997. 82p. Tese de Mestrado em Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- SILLIMAN, J.E.; MEYERS, P.A. & EADIE, B.J. Perylene: an indicator of alteration processes or precursor materials? **Organic Geochemistry**, v.29, pp.1737-44.1998.
- SUGUMARAN, M. & BOLTON, J.L. Laccase, and not tyrosinase, in the enzyme responsible for quinone methide production from 2,6-dimethoxy-4-allyl phenol. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.353, n.2, pp.207-212. 1998.
- SUN, K.M.; JEE, H.E.; KYUNG, K.H. & WOONG, M.K. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by selected white rot fungi and the influence of lignin peroxidase. **Journal of Microbiological Biotechnology**, v.8, n.2, pp.129-133.1999.
- SUTHERLAND, J.B. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. **Journal of Industrial Microbiology**, v.9, pp.53-62. 1992.

- SYLDATK, C. & WAGNER, F. production of biosurfactants. In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L. & GRAY, N.C.C. **Biosurfactants and Biotechnology**. (ed.). New York, Basel: Marcel Dekker, Inc. 1987. capto 3, p.342.
- SZKLARZ, G.D.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L. & LINKINS, A. E. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycology**, v.81, pp.234-240. 1989.
- TAGGER, S.; PÉRISSOL, C.; GIL, G.; VOGT, G. & LE PETIT, J. Phenoloxidases of the White-rot fungus *Marasmius quercophilus* isolated from an evergreen oak litter (*Quercus ilex* L.). **Enzyme and Microbial Technology**, v.23, pp.372-379. 1998.
- TEN HULSCHER, T.E.M.; VRIND, B.A.; VAN DEN HEUVEL, H.; VAN DER VELDE, L.E.; VAN NOORT, P.C.M.; BEURSKENS, J.E. & GOVERS, H.A.J. Triphasic desorption of highly resistant chlorobenzenes, polychlorinated byphenils and polycyclic aromatic hydrocarbons in field contaminated sediment. **Environmental Science and Technology**, v.33, pp.126-132. 1999.
- THURSTON, C.F. The structure and function of fungal Laccases. **Microbiology**, v.140, pp.19-26. 1994.
- TIEN, M. & KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification , characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂ requiring oxygenase. **Proccedings of National Academy of Science USA**, v.81, pp. 2280-2284. 1984.
- TIEN, M. & KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Burds. Science**, v.221, pp.661-663. 1983.
- TIMOFEEVSKY, S. L.; NIE, G.; READING, N.S. & AUST, S.D. Substrate specificity of lignin peroxidase and a S168W variant of manganese. **Archives of Biochemistry and Biophysic**, v.373, pp.147-153. 2000.

- TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A. & ITAVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresources Technology**, v.72, pp.169-183. 2000.
- TUOR, U.; WARIISHI, H.; SHOEMAKER, H.E. & GOLD, M.H. Oxidation of phenolic arylglycerol- β -aryl-ether lignin model compounds by Manganese-Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*; oxidative cleavage of an α -carbonyl model compound. **Biochemistry**, v.31, pp.4986-4995. 1992.
- TUOR, U.; WINTERHALTER, K. & FIECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology**, v.41, pp.1-17. 1995.
- VARELA, E.; MARTÍNEZ, M.J. & MARTÍNEZ, A.T. Aryl-alcohol oxidase protein sequence: a comparison with glucose oxidase and other FAD oxidoreductases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1481, pp.202-208. 2000.
- WADA, S.; ICHIKAWA, H. & TATSUMI, K. Removal of phenols with tyrosinase immobilized on magnetite. **Water of Science Technology**, v.26, pp.2057-2062. 1992.
- WANG, Y. & YU, J. Adsorption and degradation of synthetic dyes on the mycelium of *Trametes versicolor*. **Water of Science Technology**, v.38, n.4-5, pp.233-238. 1998.
- WARIISHI, H. VALLI, K. & GOLD, M.H. Mn(II) oxidation by manganese-oxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, n.23, pp.688-695. 1992.
- WARIISHI, H.; MARQUEZ, L.; DUNFORD, H.B. & GOLD, M.H. Lignin peroxidase compounds II e III. Spectral and kinetic characterization of reactions with peroxidases. **Journal of Biology and Chemistry**, n.265, pp.11137-11142. 1990.
- WISCHMANN, H. & STEINHART, H. The formation of PAH oxidation products in soils and soil compost mixtures. **Chemosphere**, v.35, n.8, pp.1681-1698. 1997.

YUANG, S.Y.; WEI, S.H. & CHANG, B.V. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. **Chemosphere**, v.41, pp.1463-1468. 2000.

ZAPANTA, L.S. & TIEN, M. The roles of veratryl alcohol and oxalate in fungal lignin degradation. **Journal of Biotechnology**, v.53, pp.93-102. 1997.

